

**MONTPELLIER SUPAGRO**

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO**

*Discipline : BIOCHIMIE, CHIMIE ET TECHNOLOGIE*

***DES ALIMENTS***

*École doctorale : Sciences des Procédés – Sciences des Aliments*

Présentée par

**Mohamed CISSE**

Le 06 Juillet 2012

**Immobilisation d'un système lactoperoxydase dans un  
enrobage de chitosane dans le but de prolonger la conservation  
des mangues**

**Jury**

**Essaid Ait BARKA**

**Huguette SALLANON**

**Lan TIGHZERT**

**Didier MONTET**

**Gérard LOISEAU**

**Marie-Noelle Ducamp COLLIN**

Dr Université de Reims

Pr Agrosiences Avignon

Pr ESI Reims

Dr CIRAD Montpellier

Dr Sup Agro Montpellier

Dr CIRAD Montpellier

Rapporteur

Examineur

Rapporteur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Encadrant

CIRAD



\*0000120660\*

## Remerciements

Le présent travail a été réalisé au sein des laboratoires de l'UMR Qualisud au CIRAD. Je voudrais donc remercier le CIRAD en particulier UMR Qualisud et ses responsables pour m'avoir reçu dans ses laboratoires et soutenu durant ces trois années.

Ce travail a abouti à ce jour grâce au financement apporté par le Gouvernement Ivoirien que je remercie très sincèrement.

Je remercie grandement mon directeur de thèse Monsieur Didier MONTET, responsable de l'Unité mixte de recherche "Qualité des Aliments du sud" au CIRAD de Montpellier (France) pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être mon Directeur de Thèse. La pleine confiance qu'il m'a accordée, sa présence, sa disponibilité, son soutien, son aide, ses conseils, son appui scientifique et son amitié ont été des éléments très importants dans l'élaboration de ce travail. Je voudrais aussi le remercier pour l'accueil familial, le soutien moral et pour m'avoir fourni d'excellentes conditions financières pour mon épanouissement loin des miens. Je souhaite remercier sincèrement la famille MONTET. Les mots ne suffisent pas pour exprimer tout le bien que je ressens, merci.

Je remercie sincèrement mon Encadrant de thèse, Mme DUCAMP Marie-Noëlle, qui a été au four et au moulin, qui a toujours eu des mots pour me remonter le moral. Encore merci pour ta patience, ton aide et ta disponibilité scientifique au cours de mes années passées au CIRAD.

J'exprime mes remerciements également à M. Gérard LOISEAU pour sa participation à l'élaboration de cette thèse.

Je remercie sincèrement Dr Max REYNES pour ses conseils. Je souhaite aussi lui exprimer ma sincère reconnaissance pour sa confiance, ses suggestions et son amitié.

Un grand merci à Maria Soledad TAPIA et Christian GHIDELLI pour leur contribution à ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr Jean-Christophe MEILE pour sa grande participation à l'élaboration de ce travail. Merci pour ton amitié.

Mes remerciements s'adressent également à toutes les secrétaires du l'UMR Qualisud (Jocelyne, Chantal CANALES, Nathalie PAILLUSSON Marie Pierre, Nadine), merci pour leur bonne humeur et leur disponibilité.

J'adresse mes sincères remerciements à toute l'équipe précisément :

- Mr. Noël DURAND et Mme Isabelle METAYER pour leur bonne humeur, leur disponibilité et leur contribution à la réalisation de ce travail,



- EL SHEIKHA Aly, Mmes Catherine BRABET et Edna, pour leur encouragement leurs suggestions, leur amitié et leur collaboration,

Mr. Thierry GOLI et Marc LEBRUN pour les conseils, les suggestions et leur disponibilité.

Merci aussi aux techniciens qui ont eu à m'épauler, je pense à, Pascaline ALTER, Nelly, Adrien SERVENT, Julien RICCI, Pierre PRUVOST, Jean Paul, Jean Claude...

Je tiens à remercier l'ensemble des thésards et stagiaires, entre autre Mady, Doudjo, Ibrahima, Aurelien, Suzie, Jessica, Amine, Adjé.....avec lesquels j'ai passé ces années de fraternité, d'entre-aide et de convivialité. Merci à NGANOU pour tes précieux conseils

Un merci tout particulier à Mlle KOUAKOU Amenan Clémentine qui m'a beaucoup aidé durant toute la période de thèse. Merci d'avoir été là et d'être la personne que tu es !

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Je ne saurais finir sans remercier les personnes qui ont participé activement à faire de moi l'homme que je suis. Je veux parler de mes parents, de ma famille en Côte d'Ivoire et en Europe.

Grand Merci à ma sœur Maimouna dit Fatim, à Magali....et Bienvenu à Raphaël....

Enfin mes remerciements vont à tous ceux qui, de près et de loin, ont contribué à l'élaboration de cette thèse.

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>4</b>
<b>I.1 Mangues.....</b>	<b>5</b>
I.1.1 Généralités. ....	5
I.1.2 Description.....	5
I.1.3 Composition biochimique et valeur nutritive .....	6
I.1.4 Production et consommation.....	7
I.1.5 La physiologie post récolte de la mangue.....	10
I.1.5 1 La respiration .....	10
I.1.5 2 La transpiration .....	11
I.1.5 3 Changement physique et chimique du fruit .....	11
I.1.6 Les maladies post-récolte.....	12
I.1.6.1 L'anthracnose.....	13
I.1.6.2 La pourriture pédonculaire de la mangue (Stem-end Rots).....	15
I.1.7 Méthodes de conservation des fruits .....	17
I.1.7.1 La réfrigération.....	17
I.1.7.2 Atmosphères contrôlées .....	17
I.1.7.3 Atmosphères modifiées.....	17
<b>I.2 Enrobages ou films comestibles .....</b>	<b>18</b>
I.2.1 La cellulose .....	20
I.2.2 L'amidon.....	20
I.2.3 Film et enrobage à base d'alginate.....	20
I.2.4 Film et enrobage à base de carragénine .....	21
I.2.5 Le Chitosane .....	21



I.2.5.1 Caractéristiques du chitosane .....	22
I.2.5.2 Activité du chitosane en fonction des paramètres abiotiques .....	24
I.2.5.3 Exemples d'utilisation du chitosane .....	25
<b>I.3 Les emballages antimicrobiens .....</b>	<b>26</b>
I.3.1 Les agents antimicrobiens alimentaires .....	26
I.3.1.2 L'incorporation des agents antimicrobiens dans un emballage ou enrobage comestible .....	26
I.3.3 Quelques molécules naturelles utilisées dans la conservation des aliments .....	27
I.3.3.1 Les acides carboxyliques et leurs sels .....	27
I.3.3.2 Les bactériocines .....	28
I.3.3.3 Les enzymes .....	28
I.3.3.4 Les lysozymes .....	28
I.3.3.5 Le système lactoperoxydasique (LPOS) .....	29
I.3.4 Les composants .....	29
I.3.4.1 La lactoperoxydase .....	29
I.3.4.2 Le thiocyanate .....	30
I.3.4.3 Le peroxyde d'hydrogène .....	30
I.3.5 Le fonctionnement du système Lactoperoxydase .....	31
I.3.5.1 Activités antimicrobiennes .....	33
I.3.5.1.1 Activités antibactériennes .....	33
I.3.5.1.2 Effet antifongique du système lactoperoxydase .....	33
I.3.5.1.3 Effet antiviral du système lactoperoxydase .....	33
I.3.6 Applications et utilisations du système lactoperoxydasique .....	36
<b>I.4 Immobilisation d'enzyme dans un Emballage .....</b>	<b>36</b>
I.4.1 Techniques d'immobilisation .....	37

I.4.1.1 Propriétés des enzymes immobilisées .....	40
I.4.1.2 Relation enzyme - support .....	40
<b>I.5 Techniques de fabrication et d'application des films comestibles .....</b>	<b>42</b>
I.5.1 Influence de la formulation sur les propriétés filmogènes.....	42
I.5.1.1 Les plastifiants.....	43
I.5.1.2 Plastification du chitosane .....	44
I.5.2 Principe de l'enrobage .....	45
I.5.3 Structure moléculaire et propriétés filmogènes.....	45
I.5.4 Caractérisations physiques des films d'enrobage.....	45
I.5.4.1 La cohésion .....	46
I.5.4.2 L'adhérence.....	46
I.5.5 Technique d'enrobage des aliments .....	46
I.5.5.1 Immersion .....	47
I.5.5.2 Pulvérisation.....	47
I.5.5.3 Enrobage par film tombant .....	47
I.5.6 Transferts de matière au travers des films et enrobages comestibles .....	47
I.5.6.1 Le coefficient de diffusion .....	48
I.5.6.2 La sorption et le coefficient de solubilité.....	48
I.5.6.3 Le coefficient de perméabilité.....	48
<b><u>CHAPITRE II : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE CHITOSANE ET</u></b>	
<b><u>DU GLYCEROL SUR LES PROPRIETES D'UN FILM COMESTIBLE.....</u></b>	<b>49</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>50</b>
<b>II.1 Introduction .....</b>	<b>52</b>
<b>II.2 Materials and Methods.....</b>	<b>54</b>
<b>II.2.1 preparation of Film Forming Solutions .....</b>	<b>54</b>

II.2.2 Film Preparation.....	55
II.2.3 Permeability Measurement.....	55
II.2.4 Water Vapor Permeability (WVP).....	55
II.2.5 Mechanical Properties.....	56
<b>II.3 Experimental Design and Data Analysis.....</b>	<b>56</b>
<b>II.4 Results and Discussion.....</b>	<b>58</b>
II.4.1 Permeability Measurement.....	60
II.4.2 Water Vapor Permeability (WVP).....	62
II.4.3 Mechanical Properties.....	63
II.4.4 Optimal Composition of Chitosan–Glycerol Film.....	65
<b><u>CHAPITRE III : INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE L'HUMIDITE</u></b>	
<b><u>RELATIVE SUR L'IMMOBILISATION DU SYSTEME LACTOPEROXYDASE .....</u></b>	<b><u>67</u></b>
<b>Résumé.....</b>	<b>68</b>
<b>III.1 Introduction.....</b>	<b>70</b>
<b>III.2 Materials and methods.....</b>	<b>72</b>
III.2.1 Preparation of lactoperoxidase system solution.....	72
III.2.2 Preparation of chitosan-LPOSI film.....	72
III.2.3 Sample preparation for SCN- and OSCN-, OI- analyses.....	73
III.2.3.1 SCN- analysis.....	73
III.2.3.2 OSCN-, OI- analysis.....	73
III.2.4 Antimicrobial properties of the chitosan film incorporating lactoperoxidase system...	74
III.2.5 Chitosan film permeability to gas (O <sub>2</sub> and CO <sub>2</sub> ).....	74
III.2.6 Chitosan film permeability to water vapor (WVP).....	75
III.2.7 Experimental design and data analysis.....	75
<b>III.3 Results and discussion.....</b>	<b>76</b>



III.3.1 [SCN-] and [OSCN-, OI-] analysis.....	76
III.3.2 Effect of LPOS-chitosan on <i>X. campestris</i> pv. <i>mangifera indica</i> .....	81
Figure:4 Antimicrobial effect of chitosan films with or without lactoperoxidase system against <i>X. campestris</i> pv. <i>mangifera indica</i> . ....	82
III.3.3 Influence of LPOSI on chitosan film permeability to water and gases .....	82
III.3.4 Conclusions .....	83
<b><u>CHAPITRE IV : PROPRIETES ANTIMICROBIENNES ET PHYSIQUES DES FILMS DE CHITOSANE ENRICHIS PAR LES SYSTEME LACTOPEROXYDASE.....</u></b>	<b>84</b>
<b>IV.1 Introduction .....</b>	<b>87</b>
<b>IV.2 Materials and Methods .....</b>	<b>89</b>
IV.2.1 Preparation of chitosan film forming solutions .....	89
IV.2.2 Preparation of LPOS .....	89
IV.2.3 Chitosan-LPOS film preparation .....	89
IV.2.4 Inoculation techniques .....	90
IV.2.4.1 Determination of bacterial inhibition zone by spreading technique on Petri dish .....	90
IV.2.4.2 Determination of radial growth by puncture technique .....	90
IV.2.5 Water vapor permeability (WVP) .....	91
IV.2.6 Mechanical properties .....	91
<b>IV.3 Results and discussion .....</b>	<b>91</b>
IV.3.1 Effect of chitosan-LPOS on <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>mangifera indica</i> .....	91
IV.3.2 Effect of chitosan-LPOS on moulds .....	93
IV.3.3 Water vapor permeability and mechanical properties (Tensile strength and elongation at break).....	97
<b>IV.4 Conclusion .....</b>	<b>97</b>

## **CHAPITRE V : EFFET ANTIFONGIQUE DU COUPLAGE CHITOSANE-LPOS SUR DES SOUCHES *Phomopsis sp. Rp257* et *Pestalotiopsis sp* ISOLEES DES MANGUES..99**

<b>V.1 Introduction .....</b>	<b>101</b>
<b>V.2 Matériels et Méthodes.....</b>	<b>102</b>
V.2.1 Isolement des souches de moisissures .....	102
V.2.2 Protocole d'extraction .....	102
V.2.2.1 Vérification de l'extraction d'ADN sur gel d'agarose.....	103
V.2.2.2 Amplification des ADN extraits par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).103	
V.2.2.3 Séquençage des fragments d'ADN du produit PCR et identification des souches...104	
V.2.3 Préparation de la solution de LPOS .....	104
V.2.4 Préparation de la solution filmogène .....	104
V.2.5 Préparation des films enrichis au LPOS.....	105
V.2.6 Evaluation de l'activité antifongique in vitro du chitosane et le LPOS .....	105
<b>V.3 Résultats .....</b>	<b>106</b>
V.3.1 Isolement des souches de moisissures et identification des souces .....	106
V.3.2 Effet Antifongique .....	107
<b>V.4 Discussion .....</b>	<b>108</b>
<b>V.5 Conclusion .....</b>	<b>110</b>

## **CHAPITRE VI : EFFET DU COUPLAGE CHITOSANE-LPOS SUR LA QUALITE DE LA CONSERVATION POST-RECOLTE DES MANGUES.....111**

<b>VI.1 Introduction.....</b>	<b>113</b>
<b>VI.2 Matériels et Méthodes .....</b>	<b>114</b>
VI.2.1 Matériels.....	114
VI.2.1.1 Végétal .....	114
VI.2.1.2 Biochimique .....	114

VI.2.1.3 Microbiologique .....	115
VI.2.2 Préparation de la solution de LPOS.....	115
VI.2.3 Préparation de la solution filmogène .....	115
VI.2.4 Tests antimicrobiens .....	116
VI.2.5 Mesure de la respiration des fruits.....	116
VI.2.6 Evaluation de la qualité des mangues.....	117
VI.2.6.1 Perte de poids .....	117
VI.2.6.2 Fermeté.....	117
VI.2.6.3 Mesure de la couleur de la peau des fruits .....	117
VI.2.6.4 Extrait sec soluble.....	118
VI.2.6.5 pH, Acidité .....	118
<b>VI.3 Résultats et Discussion .....</b>	<b>119</b>
VI.3.1 L'activité antimicrobienne de l'enrobage chitosane-LPOS .....	119
VI.3.2 L'intensité respiratoire .....	122
VI.3.2.1 Consommation d'oxygène des fruits .....	122
VI.3.2.2 La production de CO <sub>2</sub> .....	123
VI.3.3 La perte de poids des fruits au cours de la conservation.....	124
VI.3.4 L'évolution de la couleur .....	125
VI.3.5 La fermeté .....	127
VI.3.6 Changement de la composition chimique .....	128
VI.3.6.1 pH .....	128
VI.3.6.2 Acidité titrable .....	128
VI.3.6.3 Extraits secs solubles .....	128
VI.3.6.4 Vitamine C (acide ascorbique) .....	129
<b>VI.4 Conclusion .....</b>	<b>130</b>



**CHAPITRE VII : SYNTHÈSE DES RESULTATS ET DISCUSSION GÉNÉRALES.131**

**Conclusion Générale et Perspectives .....137**

**References .....138**

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les fruits et légumes sont des denrées hautement périssables qui demandent à être manipulées avec beaucoup de soins pour minimiser les pertes. En raison de leur forte teneur en eau, ils sont intrinsèquement susceptibles de se détériorer en particulier dans des conditions tropicales. Après la récolte, ils restent vivants et sont soumis aux phénomènes de transpiration, de respiration, de maturation et d'autres activités biochimiques, qui se traduisent par une détérioration de la qualité. Parmi ces végétaux, la mangue occupe une place très importante du point de vue nutritionnel et économique. Elle occupe la 2<sup>e</sup> place dans la production des fruits tropicaux derrière la banane, et sa production annuelle ne cesse de croître. Selon les données de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), la production globale de mangues a atteint approximativement 34 millions de tonnes en 2007. Cette forte production est confrontée à une grande perte des produits entre la récolte et la commercialisation. Moins de 4 % de la production est exporté, le reste est destiné à la consommation locale, à la transformation ou se détériore faute de procédés de stockage. Cette difficulté commerciale est liée au mûrissement rapide des fruits aboutissant à la sénescence ou à la dégradation physiologique causée par des pathogènes. Pour accroître l'exportation des fruits vers les marchés européens, il serait intéressant de développer une méthode simple et sûre qui soit réalisable chez les petits planteurs pour prolonger la durée de conservation de cette culture, par un conditionnement approprié afin qu'elle puisse être transportée et commercialisée à un meilleur prix.

L'utilisation d'un film d'enrobage comestible antibactérien a été proposée comme une approche innovatrice pour minimiser ou prévenir le développement des microorganismes indésirables. Des composés chimiques tels que les acides organiques ou inorganiques, certains métaux, les alcools, les composés ammoniums ou amines sont incorporés dans les films d'enrobages des produits fruitiers comme agents antimicrobiens. Cependant, à la demande des consommateurs qui exigent de plus en plus l'utilisation des molécules naturelles, des agents antimicrobiens naturels (biopréservateurs) comme les bactériocines, les enzymes, et les extraits de fruits sont utilisés en lieu et place des conservateurs synthétiques. Ces molécules naturelles sont incorporées dans la matrice biomatériau permettant de maîtriser leur désorption puis diffusion à la surface du produit alimentaire avec pour objectif le maintien de la concentration minimale inhibitrice à la surface du produit. Ces biopréservateurs présentent une alternative à la réduction de l'utilisation des pesticides de synthèse. L'un des biopréservateurs, les plus étudiés aujourd'hui après le lysozyme et la nisine est le système

lactoperoxydase (LPOS), un système enzymatique utilisé dans la conservation naturelle des produits laitiers. Il présente un large spectre antimicrobien (antibactérien, antifongique et antiviral). Des études récentes sur ce système ont permis d'optimiser son efficacité antimicrobienne et ses champs d'action. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse dont l'objectif est de renforcer et de faire perdurer l'efficacité de la LPOS par son incorporation dans un biomatériau formant ainsi un enrobage dit actif.

Récemment, la recherche sur le développement de films comestibles à base de polysaccharides a été orientée vers le chitosane. Le chitosane, extrait de l'exosquelette des crustacés, présente une activité antimicrobienne. C'est le seul biopolymère chargé positivement lorsqu'il est dissout dans une solution d'acide faible. Cette charge cationique permet au chitosane en solution de réagir avec tous les composés biologiques à charge négative (comme les lipides ou des protéines) et de les fixer solidement par des liaisons ioniques. De plus, le film de chitosane est biodégradable, clair, résistant, flexible et présente une perméabilité sélective à l'oxygène et au dioxyde de carbone permettant ainsi un meilleur contrôle de l'atmosphère interne du fruit durant le stockage et la distribution. Toutes ces caractéristiques ont suscité un intérêt majeur pour l'utilisation du chitosane dans l'enrobage des fruits et légumes frais afin d'augmenter leur durée de conservation. Cependant, la contrainte de l'utilisation du chitosane réside dans sa perméabilité élevée à la vapeur d'eau, surtout aux fortes humidités relatives et sa friabilité au toucher.

**L'objectif** de cette étude est de développer un enrobage actif à base de chitosane enrichi au LPOS, capable de réduire la prolifération microbienne et de retarder la maturation des fruits facilitant ainsi leurs transports.

### **La démarche expérimentale**

Dans la première partie de ce travail (**chapitre I**), nous avons fait une synthèse bibliographique sur la mangue et les enrobages actifs.

La seconde étape a consisté à déterminer la concentration optimale de chitosane et de glycérol capable de produire un film sélectif au gaz ( $O_2$  et  $CO_2$ ), avec une bonne propriété de barrière à la vapeur d'eau et possédant d'excellentes propriétés mécaniques. (**Chapitre II ; publication 1**).

**Le chapitre III** étudie l'influence de différents facteurs (température, humidité relative et le temps de séchage des films) sur la production des molécules actives du LPOS dans la matrice de chitosane. (**Publication 2**).



**Le chapitre IV (Publication 3) et V** évaluent l'efficacité antimicrobienne *in vitro* de films obtenus à partir du couplage chitosane-LPOS contre diverses souches microbiennes responsables de la détérioration des mangues.

Enfin dans la dernière partie (**Chapitre VI**), le couplage Chitosane-LPOS a été testé sous forme d'enrobage dans la conservation des mangues. L'activité antimicrobienne et le ralentissement des processus physiologiques responsables de la maturation des fruits, par l'enrobage à base de chitosane incorporé par le LPOS avec ou sans iode ont été déterminés.

# **CHAPITRE I**

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I.1 Mangues**

### **I.1.1 Généralités.**

La mangue, originaire de l'Inde, est devenue aujourd'hui l'un des fruits majeurs dans les zones tropicales et subtropicales, en particulier en Asie, où elle occupe une place très importante, d'où son appellation de « roi des fruits ». La croissance rapide de sa production au cours de ces dernières années est due à, l'expansion de nouvelles régions de culture surtout en Chine et en Afrique, de nouvelles sélections de plantules, à l'adoption de pratiques modernes dans les champs incluant les techniques d'irrigation, le contrôle de la pollinisation, etc. Elle est cueillie sur des manguiers, arbres pouvant atteindre jusqu'à 30 mètres de haut. Il pousse dans des sols très variés, mais préfère cependant des sols profonds, assez légers ou de structure moyenne, capables d'assurer une pénétration suffisante des racines, une bonne aération et un bon drainage. La multiplication des manguiers se fait essentiellement par greffage. Le manguier a besoin de repos végétatif pour fleurir. Ce repos dont la durée est de 2 à 3 mois est d'une grande importance pour la fructification car il conditionne le calendrier des irrigations et l'apport en éléments fertilisants. Il n'y a en général qu'une période de floraison dans l'année, avec de légères différences de dates selon les variétés (Bafodé 1988). Le temps de maturation du fruit varie selon les espèces.

### **I.1.2 Description.**

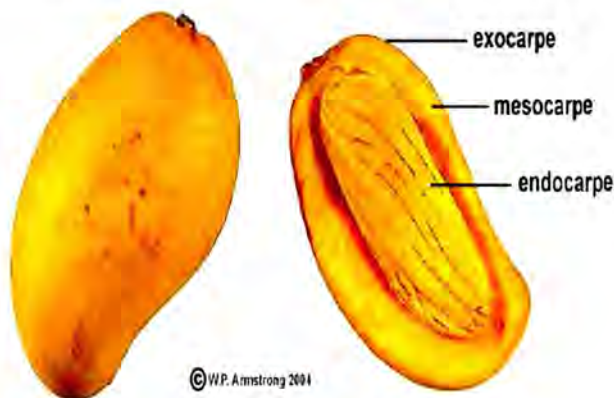
On recense environ 62 espèces arborescentes de manguier dont l'une d'elle, la plus connue, *Mangifera indica*, comprend plus de 1000 variétés (Singh 1967). Soumah (1988) et Laroussilh (1980) distinguent deux grandes catégories dans cette espèce :

- les variétés locales, encore appelées «mango», dont les fruits ont un gros noyau prolongé de longues fibres qui pénètrent jusqu'au cœur de la pulpe. Ces fruits dégagent une odeur de térébenthine,
- les variétés greffées ou améliorées qui produisent des fruits beaucoup plus prisés des consommateurs. Parmi celles-ci, on peut citer les variétés Kent, Keitt, Amélie, Julie, Sensation, Alfonso, Zill, Early, Gold, Irwim etc...

La mangue comprend principalement trois parties (Figure 1): l'exocarpe, le mésocarpe et le noyau. La peau ou exocarpe, est la partie externe qui recouvre le fruit. Elle devient jaune, orange, rouge ou demeure verte à maturité selon les variétés. La pulpe ou mésocarpe, est la partie comestible du fruit. Les variétés améliorées contiennent moins de fibres dans le mésocarpe et sont plus acceptées des consommateurs que les variétés sauvages. Le noyau, ou



endocarpe, présente une insertion de fibres, et possède une cavité dans laquelle loge l'amande.



**Figure 1:** coupe d'une mangue

### **I.1.3 Composition biochimique et valeur nutritive**

Certaines variétés de mangues sont considérées comme des variétés pulpeuses (Early, Gold, Keith, Kent, Palmer, Smith et Springfield) et d'autres comme des variétés juteuses (Julie, Zill) (figure 2). La pulpe de mangue est un aliment de forte valeur nutritive, majoritairement constituée d'eau et de glucides, de vitamines et de minéraux. La mangue contient cependant une faible quantité de protéines et de lipides. La valeur énergétique de la pulpe de mangue varie de 50 à 60 calories pour 100 g de produit frais ou plus selon les variétés (Laroussilhe 1980). La présence de fibres en quantité importante fait de la mangue un aliment qui facilite la digestion. De plus, la mangue est appréciée pour sa richesse en antioxydants (vitamine C, caroténoïdes et polyphénols) et en minéraux (calcium et potassium). Le Tableau 1 présente la composition de la mangue à maturité.

**Tableau 1:** Composition chimique et valeur nutritive des mangues (Laroussilhe 1980).

<b>Valeur moyenne</b>		
<b>Composition</b>	Mangue verte	Mangue mûre
<b>Eau %</b>	90,0	96,1
<b>Protéines %</b>	0,7	0,6
<b>Lipides %</b>	0,1	1,8
<b>Glucides %</b>	8,8	0,1
<b>Fibres %</b>	–	1,1
<b>Matières minérales %</b>	0,4	0,3
<b>Calcium %</b>	0,01	0,01
<b>Phosphore %</b>	0,02	0,02
<b>Fer (mg/g)</b>	4,5	0,3
<b>Vitamine A (U.I)</b>	150	4800
<b>Riboflavine (mg/g)</b>	0,03	0,05
<b>Thiamine (mg/100g)</b>	–	0,04
<b>Vitamine C (mg/100g)</b>	3	13
<b>Acide nicotinique (mg/100g)</b>	–	0,3
<b>Valeur en calories pour 100g</b>	39	50 à 60

#### I.1.4 Production et consommation

L'Asie, concentre plus de 77 % des surfaces de la production suivie de l'Amérique latine et de l'Afrique, lesquelles participent respectivement à 14% et 9% de la production mondiale. Comme le montre le tableau 2, l'Inde concentre à elle seule près de la moitié (40%) de la production mondiale suivie par la Chine (11%), le Pakistan (7%) et le Mexique (6%).

**Table 2** : Production mondiale de mangue en 2007 exprimée en tonnes et en pourcentage (Fruitrop 2009)

<b>Pays</b>	<b>Production mondiale (tonne)</b>	<b>Production mondiale (%)</b>
Monde	33 445 000	40
Inde	13 501 000	11
Chine	3 752 000	7
Pakistan	2 250 000	6
Mexique	2 050 000	5
Thaïlande	1 800 000	5
Indonésie	1 620 000	5
Brésil	1 546 000	3
Philippines	975 000	2
Nigeria	734 000	2
Egypte	320 000	1
Vietnam	370 000	1
Yémen	350 000	1
Cuba	310 000	1
Pérou	245 000	1
Haïti	260 000	1

La mangue demeure un produit exotique très prisé. Les USA sont les premiers importateurs du monde. Les volumes importés par l'Europe ne cessent de croître (184 500 tonnes en 2005 et 210 300 tonnes en 2006). Dans l'Union Européenne, la consommation se situe toutefois seulement autour de 460g/hab/an, deux fois moins qu'aux Etats-Unis (Service des Nouvelles des Marchés; SNM). En 2007 et avec 16 000 tonnes, la France reste l'un des plus gros importateurs européens de mangue mais se situe loin derrière les Pays-Bas, premier importateur de l'Union Européenne.

Les cultivars les plus exportés sont: Kent, Tommy Atkins, Haden et Keitt. Ces cultivars sont généralement rouges avec moins de fibres, fermes et plus adaptés aux longues distances de transport. Les cultivars verts tels qu'Amelie et Ataulfo, des variétés juteuses, sont également prisés sur le marché international.

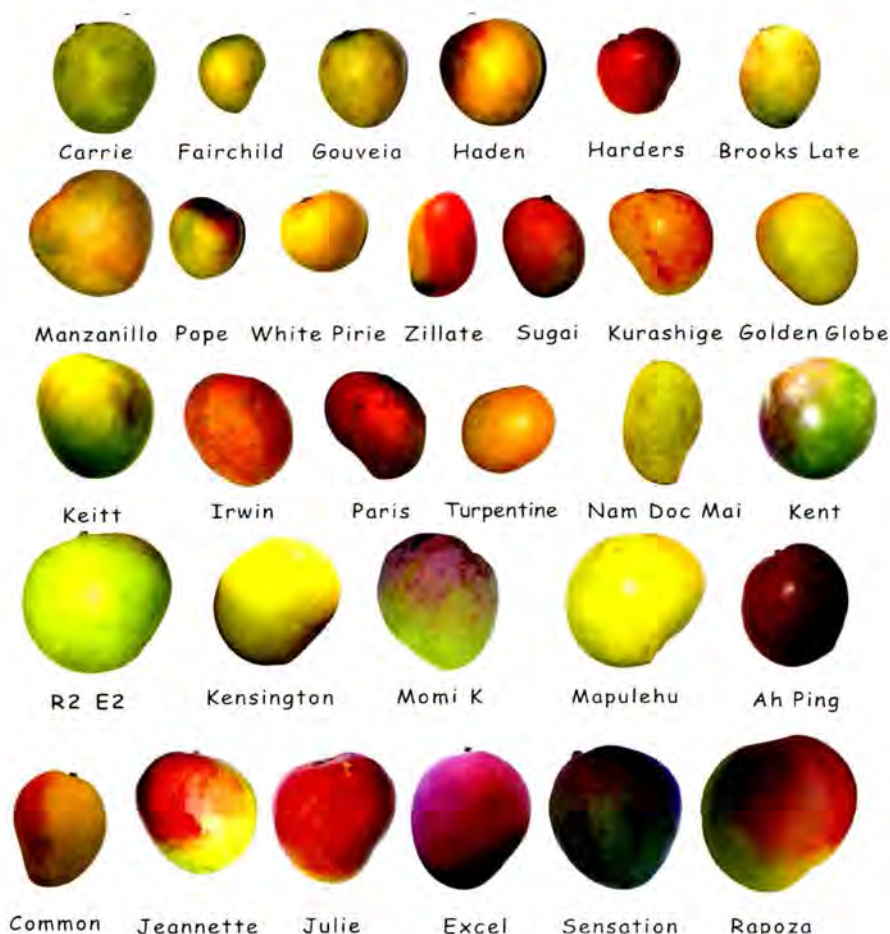


Figure 2: Quelques variétés de mangues

© <http://www.windowphonefr.com-wp-content/uploads-2011-05-mango-types.jpg>



### **I.1.5 La physiologie post récolte de la mangue**

La mangue après récolte, reste un produit vivant. Les réactions métaboliques et les processus physiologiques continuent jusqu'à la sénescence. Les principaux processus physiologiques de cette sénescence sont la respiration et la transpiration.

#### **I.1.5 1 La respiration**

C'est l'un des processus de base qui a une influence sur la maturité et le conditionnement des fruits après récolte. La respiration peut être évaluée par l'intensité respiratoire (IR) qui est la quantité d'oxygène absorbée par une quantité de produit pendant un temps déterminé ou la quantité de CO<sub>2</sub> rejetée pendant le même temps. Si l'IR est élevée, le végétal consomme rapidement ses réserves (les sucres) et évolue vers la sénescence. L'IR dépend de plusieurs facteurs dont les principaux sont la température, la composition en gaz de l'atmosphère, l'éthylène)

##### **I.1.5 1.1 La température**

Elle joue un rôle important dans la qualité des légumes frais et des fruits. Selon la règle de Van't Hoff, la vitesse d'une réaction biologique peut doubler ou même tripler pour chaque augmentation de 10°C. Cet intervalle de 10°C est appelé le coefficient de la température, ou le Q<sub>10</sub>. Ce coefficient peut être calculé en déterminant le taux respiratoire d'un fruit donné à deux températures différentes, et puis en appliquant l'équation suivante (Kader 1987):

$$Q_{10} = (R_1/R_2)^{(10/T_2-T_1)}$$

R<sub>1</sub>= taux de respiration à la température T<sub>1</sub>

R<sub>2</sub>= taux de respiration à la température T<sub>2</sub>

T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>= température (C°)

Quand la température de conservation tombe en dessous de 10 ou 12°C, la respiration devient anormale (Salveit 2005). Il se produit alors le "chilling injury", dommages qui se produisent quand des fruits sensibles au froid sont exposés aux températures de réfrigération au-dessous de leur niveau de seuil d'acceptation du froid.

##### **I.1.5 1.2 La composition en gaz de l'atmosphère**

La composition de l'atmosphère entourant le fruit affecte également l'intensité respiratoire. La concentration de l'oxygène à 20% est optimale pour les processus respiratoires. Cependant quand ce niveau chute, l'intensité respiratoire peut être diminuée. Le niveau d'oxygène autour de 2 à 3% entraîne une réduction bénéfique du taux de respiration et



d'autres réactions métaboliques des fruits et légumes. Au-dessous de ce niveau, les réactions aérobies sont empêchées, et le métabolisme s'oriente vers la voie anaérobie et la fermentation, provoquant une accumulation d'éthanol conduisant à une sénescence accélérée.

L'augmentation du niveau de dioxyde de carbone autour des fruits, réduit l'intensité respiratoire, retarde la sénescence des fruits et le développement des moisissures. Le taux de dioxyde de carbone empêche les réactions de décarboxylation de la respiration normale, et ralentit ainsi le cycle de Krebs. Cependant, si la concentration de dioxyde de carbone est trop haute (plus de 20%), la respiration anaérobie s'en suivra et par conséquent, les tissus végétaux seront endommagés.

#### **I.1.5 1.3 Effet de l'éthylène sur les produits frais récoltés**

L'éthylène, produit par la plupart des tissus végétaux, joue un rôle important dans le déclenchement du mûrissement des fruits climatériques comme la mangue. C'est un composé volatil synthétisé à certains stades de développement et de maturité. Lorsqu'il atteint une concentration assez élevée, il déclenche le processus de maturation.

Les facteurs de stress (perte d'eau, dommages physiques, attaque de pathogène, froid) stimulent la production de l'éthylène ce qui accélère la maturation. L'éthylène agit également sur la synthèse de certaines enzymes clé des altérations de la couleur (brunissement) et de la fermeté.

#### **I.1.5 2 La transpiration**

La majorité des fruits frais récoltés contiennent 65 à 95 % d'eau. Ces fruits continuent à perdre l'eau après récolte et ne peuvent compenser cette perte contrairement à la plante. Ce qui aura pour conséquence une rétraction et une diminution de poids du fruit. Lorsque cette perte atteint 5 à 10% du poids frais, le fruit commence à se faner et devient inutilisable. Le taux de déperdition d'eau des parties végétales dépend de la différence de pression entre la vapeur d'eau contenue à l'intérieur de la plante et la vapeur d'eau de l'air ambiant. Pour que les produits frais perdent le moins d'eau possible, il faut les conserver en atmosphère humide.

Le taux de transpiration est influencé par le cultivar et le stade de maturité. Il est corrélé avec l'épaisseur de la peau et sa structure morphologique.

#### **I.1.5 3 Changement physique et chimique du fruit**

Plusieurs changements dans la composition des fruits ont lieu pendant le développement, la maturation, le mûrissement et la sénescence des produits végétaux. Ces changements peuvent être désirables ou indésirables.

### **I.1.5 3 1 La couleurs**

Les changements de couleur de la mangue sont dus à la disparition de la chlorophylle et l'apparition d'autres pigments. Les chloroplastes sont transformés en chromoplastes contenant des pigments jaunes ou rouges. Dans les cultivars jaunes, les caroténoïdes et xanthophylles sont les pigments prédominants. Pendant le mûrissement des fruits, la concentration en chlorophylle diminue considérablement dans les 'Keitt', tandis que les augmentations de concentration en caroténoïdes et anthocyanes diminuent progressivement dans les 'Tommy Atkins' (Medlicott et *al*, 1986).

### **I.1.5 3 2 La flaveur**

Les fruits subissent une diminution de l'amidon et une augmentation des sucres simples et des acides après récoltes. La transformation des glucides est une caractéristique importante de la maturation. Elle va engendrer l'hydrolyse et la disparition de l'amidon d'une part; et enrichir le fruit en sucres solubles d'autre part. L'acidité diminue et des produits volatils qui constituent l'arôme caractéristique du fruit se forment. Les volatils prédominants dans certains cultivars sont les monoterpènes et sesquiterpènes (Engel and Tressl 1983; MacLeod and Snyder 1985; Pino and Mesa 2006) ainsi que les lactones et certains acides gras (Wilson et *al*, 1990).

### **I.1.5 3 3 La fermeté**

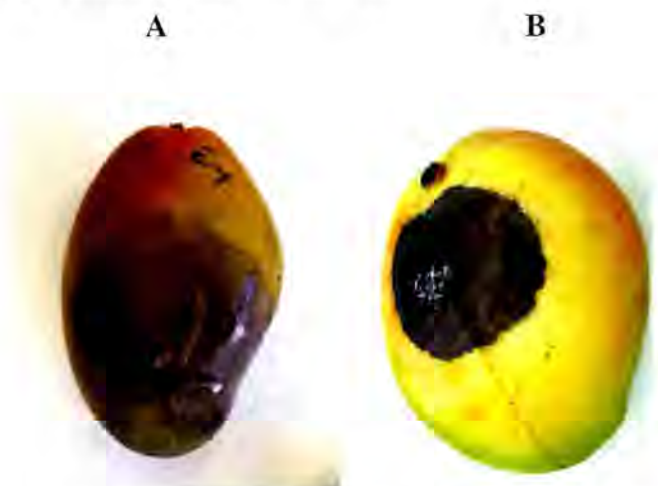
Les polysaccharides tels que les pectines, les celluloses et les hémicelluloses sont dégradés par des enzymes. Tous ces polymères sont transformés en protéines, acides aminés et lipides qui vont affecter la fermeté du fruit. Les composés pectiques de la paroi cellulaire se dégradent, les formes solubles augmentent, ce qui se traduit par une diminution de la cohésion des cellules entre elles, la chair devient fondant réduisant ainsi la fermeté.

## **I.1.6 Les maladies post-récolte**

Les maladies post-récolte peuvent réduire la qualité des fruits et provoquer de graves pertes économiques, dues à la pourriture des fruits (Figure 5). Il est clair pour le producteur que la qualité au moment de la récolte ne peut pas être améliorée, mais simplement maintenue pour une période de temps limité. La récolte des fruits au stade optimal, en ce qui concerne la taille et la maturité, peut, par conséquent, assurer une qualité de pointe et le potentiel de durée de conservation maximale. Ainsi, la gestion de la santé totale de l'arbre peut contribuer à réduire les pertes post-récoltes. Il est connu que les vergers anciens et négligés peuvent

devenir une abondante source d'inoculum pour les maladies post-récolte. De plus, les facteurs post-récolte de stress tels que l'excès ou le manque d'eau, ou les niveaux élevés d'azote dans les sols (Hawthorne 1989) peuvent rendre les fruits plus sensibles aux maladies post-récolte. La combinaison de températures élevées et une forte humidité relative (HR) peut favoriser la croissance des pathogènes post-récoltes (Banik et al, 1998).

Parmi les maladies post-récolte des mangues, l'antracnose, maladie fongique, est la plus répandue dans les zones humides. L'incidence de cette maladie peut atteindre près de 100% dans les fruits produits dans des conditions humides ou très humides. D'autres maladies post-récolte courantes dans les zones humides sont : la pourriture pédonculaire (Stem end rot), causée par *Lasiodiplodia theobromae* (Sangchote 1998) et *Dothiorella dominicana* (Johnson and Sangchote 1994) et la pourriture des moisissures noires (black mould rot) causée par *Aspergillus niger*. *Alternaria alternata* peut aussi causer des taches noires sur la mangue dans les pays arides (Prusky et al, 1983).



**Figure 3:** Maladies post-récoltes **A:** Stem and rot (pourriture pédonculaire), **B:** Anthracnose

#### **1.1.6.1 L'antracnose**

L'antracnose est une altération des productions végétales par des champignons phytopathogènes appartenant au genre *Colletotrichum gloesporioides*. Les champignons colonisent les blessures, mais aussi les fruits intacts (Figure 4). Occasionnellement, l'antracnose envahit les pédoncules abîmés et provoque aussi la brûlure des fleurs et des feuilles, et dans les cas graves, le dépérissement des arbres (Ploetz 1994; Ploetz and Prakash 1997). Elle est la principale responsable des pertes post-récolte des mangues.

Le champignon induit deux types d'infection:

- infection non latente,

- infection latente.

L'infection non latente apparaît sur les petites blessures à partir de la récolte et continue de se développer sans période de dormance. Sur les fruits verts, elle provoque des lésions qui sont généralement de couleur brune foncée ou noire, entourées d'un halo pâle, lenticulaires. L'infection non latente se manifeste sur les fruits mûrs par de nombreuses petites taches circulaires brunes ou noires. Ces taches s'élargissent et deviennent coalescentes, formant de grandes nécroses. A mesure que la maladie progresse, les zones nécrosées se dépriment et se couvrent en leur centre d'amas de spores rose saumon.

L'infection latente commence quand le fruit est encore sur la plante. Les fruits sont infectés dans le domaine, mais les infections restent passives jusqu'au début du mûrissement. Considéré comme une espèce hémibiotrophe, l'agent pathogène reste quiescent sous forme d'hyphes subcuticulaires jusqu'à l'approche de la période climatérique qui débute avec la phase de mûrissement du fruit. Lorsque l'agent pathogène reprend son activité, les lésions se développent sous forme de taches brunes (inférieure à 2 cm) caractéristiques sur les fruits. Les taches sur les fruits sont tout d'abord aqueuses, généralement de forme irrégulière et de couleur jaunâtre. Elles s'élargissent, deviennent lenticulaires ou ellipsoïdales, de couleur brun foncé ou noire, avec un halo aqueux jaunâtre. Ces taches peuvent devenir coalescentes et couvrir de vastes zones, généralement de la base vers l'extrémité distale du fruit. Elles sont généralement limitées à la peau, mais dans les cas graves le champignon peut envahir la pulpe. Il n'y a aucune infection de *Colletotrichum gloesporioides* de fruits à fruits lors de l'entreposage (Prusky et al, 2009).

*Colletotrichum gloesporioides* a besoin d'eau libre ou une HR > 95% pour la germination des conidies et la formation d'appressorium (Dodd et al, 1991). Cependant, les conidies peuvent survivre pendant 1-2 semaines sous une basse HR et germer ensuite si elles sont exposées à une humidité relative de 100%. En général, l'infection est favorisée à des températures comprises entre 20 et 30°C. La capacité de ces agents microbiens à causer des infections latentes ou de quiescences la place parmi les principales souches pathogènes post-récolte des produits végétaux.



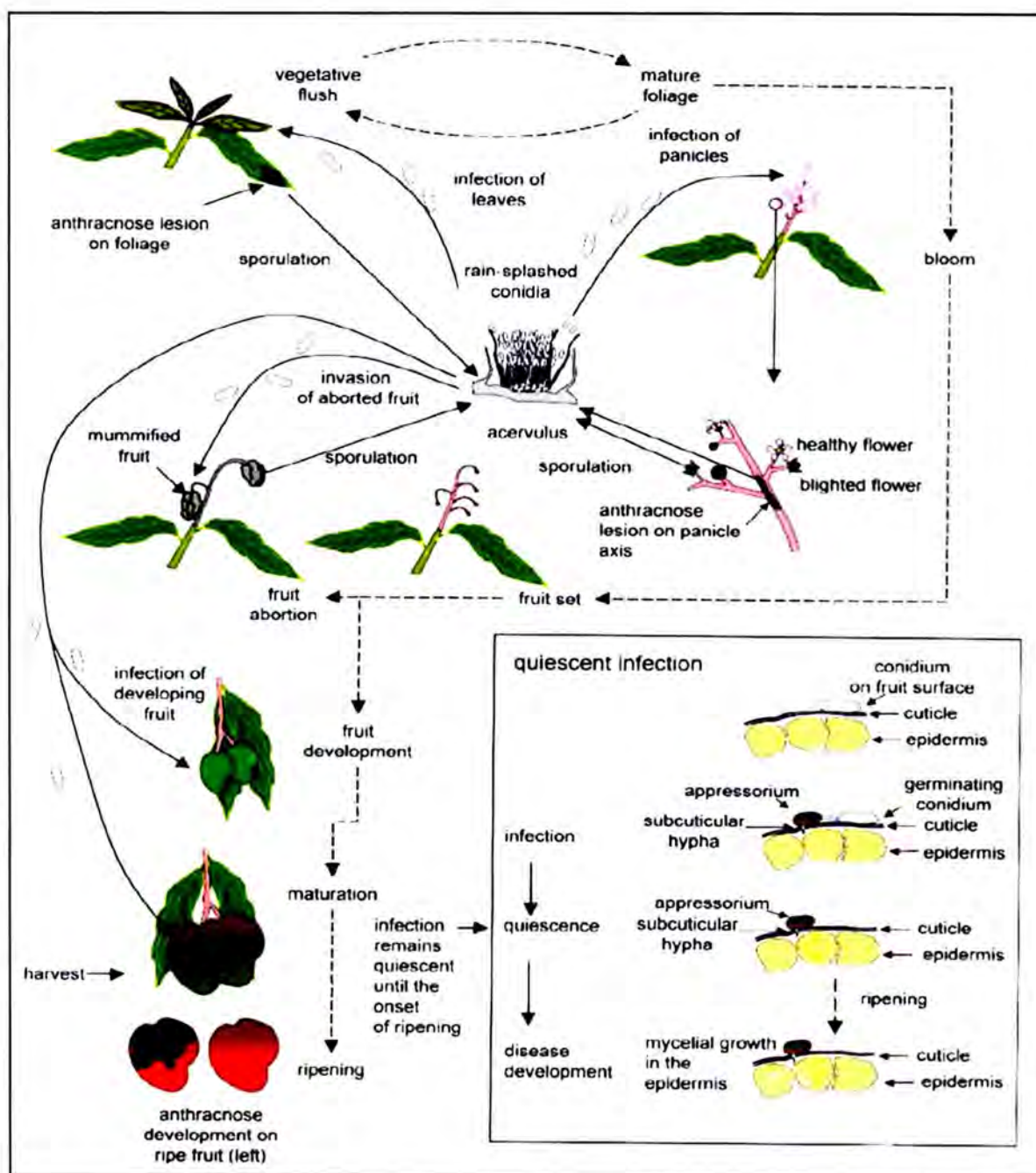


Figure 4: Cycle de la maladie d'anthracnose (Arauz 2000).

#### I.1.6.2 La pourriture pédonculaire de la mangue (Stem-end Rots)

Cette maladie est l'un des problèmes post-récolte les plus graves qui affectent la commercialisation des mangues. Elle devient plus importante quand les vergers vieillissent. Les pertes augmentent lorsque les fruits sont stockés pendant des périodes prolongées à des températures basses ou lorsque les fruits mûrissent à des températures supérieures 28 °C. Elle est causée par une variété de pathogènes fongiques, notamment: *Dothiorella dominicana* (*Botryosphaeria dothidea*), *Dothiorella mangiferae*, *Lasiodiplodia theobromae*



(*Botryodiplodia theobromae*), *Phomopsis mangiferae* et *Pestalotiopsis mangiferae*. Selon le champignon mis en cause, une variété de symptômes peut se développer au niveau du pédoncule comme sur le fruit mûr. Les infections causées par *L. theobromae* et *Dothiorella mangiferae*, provoquent la formation des tissus imbibés d'eau qui s'étendent de l'extrémité du pédoncule, s'obscurcissent et se fondent en des lésions beaucoup plus vastes (Johnson et al, 1992; Slippers et al, 2005). Ces lésions peuvent être distinguées par leurs bords noirs qui ont un aspect velouté dans le cas d'une contamination par *L. theobromae*. Dans le cas d'une contamination par *Dothiorella mangiferae*, un liquide aqueux peut s'écouler du pédoncule ou de la surface de ruptures (Korsten 2006). Les fruits malades pourraient infecter toute une caisse entière de fruits par contact direct. Le *Phomopsis mangiferae* est un parasite qui a un impact économique plus faible que les espèces ci-dessus. Il produit une lésion sombre qui se propage lentement, mais pénètre profondément dans la pulpe. Les lésions causées par *Phomopsis mangiferae* peuvent être similaires à celles causées par *C. gloeosporioides* de point de vue visuelle. Cependant ces lésions peuvent pénétrer jusqu'à une profondeur de 10 à 20 mm contrairement à *C. gloeosporioides*. *Pestalotiopsis mangiferae* apparaît en taches grises argentées qui varient en taille, et ont une bordure noire. Ils s'attaquent généralement à la plante.

La sensibilité des mangues à la pourriture diffère d'une variété à l'autre ; Tommy Atkins et Keitt sont moins sensibles que Irwin, Kent, Haden et Edward (Campbell 1992).

Face aux agressions microbiennes, les mangues opposent une résistance, dont l'ampleur va dépendre du stade de maturité. Les mangues immatures contrairement aux mangues mûres, contiennent des concentrations élevées de composés antimicrobiens naturels. Ces composés constitués de mélanges de résorcinols 5-substitués tels que le résorcinol-5-(12-heptadecadienyl) et le résorcinol-5-(pentadécyle) (Droby and Goldman 1987; Prusky 1996; Prusky et al, 2009) s'accumulent dans le péricarpe immature. Face à un tel environnement chimiquement défavorable, le champignon suspend son développement jusqu'à ce que la concentration des composés antimicrobiens diminue dans le fruit. Dans les fruits tels que les mangues, la fin de la quiescence fongique est associé conjointement à la production d'éthylène au cours de la maturation des fruits et le début de la réduction spectaculaire des résorcinols fongitoxiques préformés (Droby and Goldman 1987) ces auteurs supposent que l'éthylène est impliqué dans la terminaison de la quiescence des espèces.

## **I.1.7 Méthodes de conservation des fruits**

### **I.1.7.1 La réfrigération**

La réfrigération, ou l'abaissement de la température de stockage, peut servir à ralentir les réactions métaboliques de la respiration et de la transpiration, aussi bien que l'activité enzymatique qui peut détériorer le produit. Si les températures de stockage sont très basses, le 'chilling injury' peut en résulter. Cependant, si les températures sont trop hautes, les processus métaboliques s'accroissent.

### **I.1.7.2 Atmosphères contrôlées**

Les atmosphères contrôlées (AC) constituent l'une des techniques de conservation des végétaux, reposant sur la réduction de la respiration par modification de la composition gazeuse de l'atmosphère entourant le végétal. La réduction de la teneur en  $O_2$  et l'augmentation de  $CO_2$  provoquent la diminution de la respiration des végétaux.

La technique d'AC consiste donc à maintenir le végétal dans une chambre frigorifique étanche contenant un mélange gazeux, à faible niveau d' $O_2$  et à un niveau relativement élevé de  $CO_2$ .

Pour créer une AC désirée, on procède après remplissage de la chambre, à une injection d'azote, de façon à abaisser très rapidement le taux initial d' $O_2$ . La composition de l'atmosphère est ensuite réglée en faisant circuler, à l'aide d'un générateur de gaz et d'un ventilateur, le mélange gazeux approprié qui se trouve en contact direct avec les végétaux. Parallèlement, un contrôle de l'humidité relative permet de réduire la dessiccation des produits. Ainsi, l'AC, la réfrigération et le contrôle de l'humidité relative concourent à améliorer la conservation et à maintenir la qualité des produits. L'utilisation des systèmes de contrôles assistés par ordinateur permet d'établir rapidement les conditions de conservation dans les chambres d'entreposage et de contrôler avec précision les conditions de fonctionnement. Les principaux inconvénients de la réfrigération et des AC sont les coûts d'installation et d'entretien des chambres froides ainsi que les coûts de production et de maintien d'une atmosphère gazeuse spécifique.

### **I.1.7.3 Atmosphères modifiées**

Comme pour les AC, le principe des atmosphères modifiées (AM) est de contrôler les concentrations des gaz impliqués dans le phénomène respiratoire. L'utilisation de films d'emballage permet de modifier la composition en  $O_2$  et en  $CO_2$  de l'atmosphère autour des produits frais sans avoir à contrôler l'atmosphère de tout un entrepôt.

L'AM peut être obtenu par modification active ou passive. Dans la modification active, on modifie la composition de l'atmosphère à la fermeture lors du conditionnement, le plus généralement par balayage avec un mélange de gaz d'une composition donnée. Dans le cas d'une modification passive, la perméabilité aux gaz des films et la respiration du produit vont permettre la création d'une atmosphère équilibrée.

Dans les conditions d'équilibre, les vitesses de production et de consommation de  $\text{CO}_2$  et d' $\text{O}_2$  respectivement, sont égales aux vitesses de perméation de ces gaz à travers le film. Un système d'emballage sous AM idéal va s'équilibrer et rester à des niveaux optima de  $\text{CO}_2$  et d' $\text{O}_2$  pendant le stockage, le transport, la manipulation et la distribution du produit emballé.

L'emballage sous AM nécessite donc l'utilisation de film à perméabilité adaptée. Les perméabilités souhaitées à l' $\text{O}_2$  et au  $\text{CO}_2$  devront être définies, entre autres, en fonction de l'intensité respiratoire du végétal, de la température et de l'atmosphère souhaitée autour du produit.

Selon les propriétés de perméation du film, deux situations indésirables peuvent se produire dans l'atmosphère interne de l'emballage : d'une part, un film barrière va créer des conditions d'anaérobiose qui entraînera des détériorations physiologiques importantes. D'autre part, un film trop perméable créera des conditions d'aérobiose sans effet positif sur la respiration, pouvant induire un dessèchement et une perte de poids du produit. Pour que l'AM s'équilibre à des niveaux optima d' $\text{O}_2$  et  $\text{CO}_2$  pour la conservation du produit, le film devra donc avoir une perméabilité intermédiaire.

## **I.2 Enrobages ou films comestibles**

Les fruits ont des protections naturelles grâce à leurs peaux. Ces barrières naturelles réglementent le transport de l'oxygène, de dioxyde de carbone et de l'humidité et réduisent également la perte de la saveur et des arômes. Toutefois, la technologie alimentaire recherche à améliorer ces barrières naturelles.

D'une façon générale, un enrobage ou film comestible est défini comme une fine couche de matériau comestible déposée sur un aliment sous forme d'enrobage ou disposé sur ou entre différents constituants alimentaires. Les principales fonctions du film ou de l'enrobage comestible sont de limiter les migrations de vapeur d'eau, de dioxygène, de dioxyde de carbone, d'arômes, etc., d'améliorer l'intégrité mécanique de l'aliment et d'être éventuellement le porteur des ingrédients ou des additifs alimentaires comme les antioxydants ou les antimicrobiens (Gallo et *al*, 1999). Ainsi, ils augmentent la durée de vie de l'aliment.

Ces films font partie intégrante du produit enrobé et peuvent être consommés en même temps que le produit et par conséquent, doivent avoir des propriétés sensorielles neutres (compatible avec le produit), pour ne pas être détectés lors de la consommation (Cuq *et al*, 1995; Guilbert *et al*, 1997). Dans le cas où le bio emballage ne fait pas partie intégrante de l'aliment et ne peut pas être consommé en même temps que l'aliment, mais élaboré à partir de biomolécules, il sera alors qualifié de film biodégradable qui se définit comme étant une fine couche de matériaux complètement dégradables par les microorganismes en composés naturels ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_4$ ).

Les composés utilisés pour la formation des films ou d'enrobages comestibles dans le domaine de la conservation des aliments se divisent en trois catégories : les hydrocolloïdes, les lipides, et les composites.

- Les hydrocolloïdes sont représentés par les protéines (kératine, caséine, zéine de maïs, gluten de blé, protéine de lactosérum et de collagène) et par les polysaccharides (dérivé cellulosique, dérivé d'amidon, alginate, pectine, carragénine, gommés arabiques et chitosane).
- Les lipides sont principalement constitués par les cires, acides gras, et des monoglycérides.
- Les composites sont un mélange d'hydrocolloïdes et de lipides. Les films composites peuvent exister sous forme d'une ou double couche et ou sous forme d'émulsion.

Baldwin *et al*, (1994) ont montré que les enrobages à base de polysaccharide sont très efficaces pour la conservation des fruits et légumes frais. Ce sont des polymères très disponibles, peu coûteux, non toxiques et biodégradables (Whistley and Daniel 1991 ). Ils possèdent de très bonnes propriétés filmogènes et sont principalement utilisés comme agents stabilisants, épaississants et gélifiants (Glicksman 1982). De plus, ces films sont clairs, résistants et flexibles. Ils ont une perméabilité sélective à l'oxygène et au dioxyde de carbone, ce qui favorise un meilleur contrôle de l'atmosphère interne du fruit durant le stockage et la distribution (Peyron 1991; Kaplan *et al*, 1993) Ceci a pour effet d'augmenter la durée de vie sans toutefois engendrer de conditions anaérobies qui entraîneraient un désordre physiologique et une baisse rapide de la qualité. L'idée est de créer une atmosphère modifiée dans le produit avec un emballage totalement biodégradable.

Les polysaccharides couramment utilisés dans les enrobages des fruits et légumes sont la cellulose, l'amidon, l'alginate, carragénine et le chitosane.



### **I.2.1 La cellulose**

La cellulose est un polymère provenant directement des fibres végétales. C'est le biopolymère le plus abondant dans la nature. Certains dérivés cellulosiques comme le méthyl-cellulose (MC), l'hydroxyméthyl-cellulose (HMC) et l'hydroxypropyl-méthyl-cellulose (HPMC) possèdent d'excellentes propriétés filmogènes. Ils ont été utilisés pour retarder le mûrissement des fruits climateriques.

Les films obtenus à partir de MC sont durs et flexibles, et présentent une perméabilité à la vapeur d'eau relativement élevée. Toutefois, les MC sont les moins hydrophiles des dérivés de cellulose et donc à priori les plus résistants au transfert de vapeur d'eau. La perméabilité à la vapeur d'eau et au dioxyde de carbone des films à base de MC et HMC diminue tandis que celle de l'oxygène augmente avec l'ajout d'acides gras dans les films (Ayranci and Tunc 2003).

### **I.2.2 L'amidon**

L'amidon est un mélange d'amylose, unités glucose unies par des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), linéaire et souvent en configuration hélicoïdale et d'amylopectine très ramifiée. Les films à base d'amidons riches en amylose ou à base d'amylose sont des films comestibles très hydrophiles, et relativement faciles à produire à très faible coût. L'amidon est surtout utilisé pour faire des emballages rigides et de courte durée de vie du fait de sa sensibilité à l'humidité.

Les propriétés filmogènes de l'amidon dépendent de la masse molaire moyenne du rapport amylose/amylopectine et donc du ratio cristallin/amorphe. L'amidon de maïs riche en amylose présente une faible perméabilité de la vapeur d'eau et au gaz contrairement à l'amidon de maïs normal (García et al, 2000). Les films à base d'amidon de maïs riche en amylose contenant du sorbitol présentent une résistance à la traction plus forte que les films contenant du glycérol. (Ryu et al, 2002).

### **I.2.3 Film et enrobage à base d'alginate**

Les alginates sont des sels d'acides alginiques, généralement linéaires et composés principalement de l'acide D-mannuronique et de l'acide L-guluronique. Ils sont extraits des algues. Les alginates possèdent d'excellentes propriétés filmogènes pouvant être utilisées pour l'enrobage des fruits. Les alginates réagissent avec plusieurs cations polyvalents pour former un gel. Les ions calcium sont les meilleurs agents de gélification de ces polymères qui sont très utiles pour la formation de films ou d'enrobage. Les enrobages sont formés sur les



produits par trempage et/ou aspersion d'une solution d'alginate puis d'une solution de sel de calcium. L'enrobage obtenu est très résistant à la congélation. Il possède une teneur élevée en eau et se dessèche avant le produit. Cependant son effet protecteur contre la pénétration de l'oxygène est médiocre. Il est souvent utilisé dans l'enrobage de la viande et des fruits de mer.

#### **1.2.4 Film et enrobage à base de carragénine**

La carragénine est extraite à partir de plusieurs espèces d'algues rouges. Les gels de carragénine peuvent être utilisés pour l'enrobage des aliments. Elle a la capacité de se dessécher avant les produits, augmentant de ce fait la durée de conservation en retardant la perte d'eau de l'aliment. Les enrobages de carragénine sont souvent utilisés contre la croissance des microorganismes sur la surface des aliments à activité d'eau intermédiaire comme dans le cas des fromages enrobés par une matrice de gel de carragénine-agarose contenant de l'acide ascorbique (Torres and Kare 1985).

#### **1.2.5 Le Chitosane**

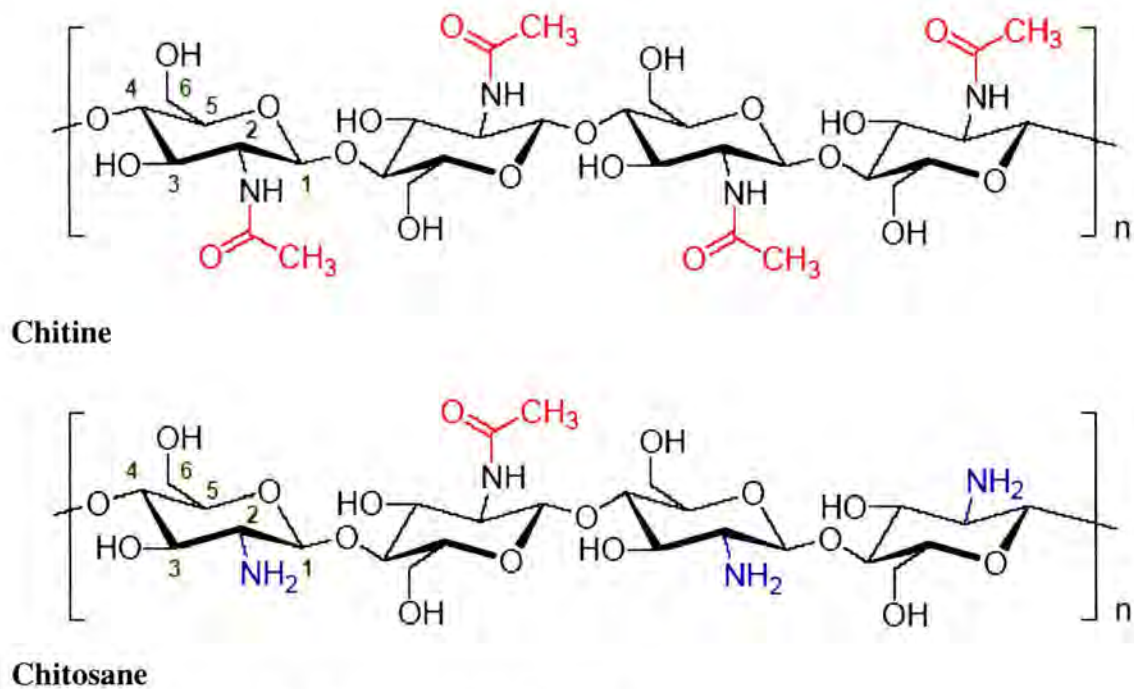
Le chitosane est un polysaccharide dérivé de la chitine, qui est un constituant de la paroi des crustacés (20 à 30 %) et des insectes. La chitine est, après la cellulose, le polysaccharide le plus répandu dans la nature. C'est un polymère composé d'unités N-acétyl-D-glucosamine et d'unités D-glucosamines, liées entre elles par des liaisons  $\beta$  1-4. La Figure 5 présente cette structure. L'obtention de la chitine se fait en 3 étapes (No et al, 2003):

- Étape 1 : La déminéralisation se fait par de l'acide chlorhydrique 1N pendant 30 min, à température ambiante et avec un rapport solide / solvant de 1/15.
- Étape 2 : La déprotéinisation est effectuée dans un autoclave avec une pression de 15Psi, sous une température de 121°C, en présence d'une solution de soude NaOH à 3% et avec un pourcentage solide/solvant de 1/10.
- Étape 3 : Le blanchiment se fait avec une solution d'hypochlorite de sodium NaClO à 0,32%, pendant 3 min et avec un rapport solide / solvant de 1/10.

La déacétylation de la chitine permet l'obtention du chitosane qui est un polymère linéaire, composé d'unités N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine, liées entre elles par des liaisons  $\beta$  1-4. On parle du chitosane à partir d'un degré de déacétylation de 60 %. La figure 5 présente la structure chimique du chitosane. Les meilleures conditions de déacétylation de la chitine (obtention d'un degré de déacétylation de 98 %) sont obtenues avec une solution de NaOH à 60 %, un chauffage de 80 °C et une durée de réaction de 120 min (Methacanon et al, 2003). Le chitosane est aussi présent dans la nature au niveau des parois cellulaires de

certaines souches fongiques, surtout les zygomycètes (Tan *et al*, 1996; Rungsardthong *et al*, 2006).

L'obtention du chitosane à partir de souches fongiques est envisageable. D'ailleurs, cette méthode présente un certain avantage par rapport au procédé habituel utilisé pour la production du chitosane à partir de la chitine, puisque l'utilisation de souches fongiques permet la modulation des caractéristiques de ce dernier. Ainsi, Chatterjee *al* (2005) ont pu obtenir du chitosane avec des masses moléculaires différentes à partir de la souche fongique *Mucor rouxii*, seulement en variant le milieu nutritionnel utilisé pour la culture de la souche.



**Figure 5 :** Structure de la chitine et du chitosane

#### 1.2.5.1 Caractéristiques du chitosane

Le chitosane est caractérisé par un degré de déacétylation (DD) et une masse moléculaire. En solution acide, le chitosane se comporte comme un polyélectrolyte cationique de forte densité de charge. Ses propriétés dépendent du pH du milieu. Le chitosane solubilisé devient cationique quand le pH est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosane soit 6,3 (Peter 1995). A un pH supérieur ( $> 6,5$ ), les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane précipite. La viscosité du chitosane en solution est influencée par différents facteurs, comme le degré de déacétylation, la masse molaire, la concentration, la force ionique, le pH et la température.

#### **I.2.5.1.1 Propriétés antimicrobiennes du chitosane**

Le chitosane possède de bonnes propriétés antimicrobiennes. Celles-ci dépendent de plusieurs facteurs : sa nature, son degré de polymérisation, son origine, la composition du substrat et des conditions environnementales comme, par exemple, l'humidité du substrat. Son action antimicrobienne comporte des effets antifongiques, antibactériens et algicides.

##### **I.2.5.1.1 1 Activité antibactérienne du chitosane**

Plusieurs travaux de recherches ont illustré l'activité antibactérienne du chitosane. Helander *et al*, (2001) ont montré que l'utilisation du chitosane à forte concentration a un effet antibactérien sur des bactéries Gram négatif comme *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. Ouattara *et al*, (2000) ont montré que des films obtenus à partir d'une solution de chitosane présentent un effet inhibiteur sur les bactéries lactiques comme *Lactobacillus sakei*. Des films composites obtenus par combinaison dans les mêmes proportions de chitosane et de HPMC, inhibent complètement la croissance de *Listeria monocytogenes* (Möller *et al*, 2004).

L'enrobage des fruits par le chitosane a également permis l'inhibition de la croissance des bactéries à Gram positif telles que *Brochotrix thermosphacta* et *Bacillus cereus* (Devlieghere *et al*, 2004). Le chitosane agit sur les bactéries à Gram positif et sur les bactéries à Gram négatif, cependant, son action sur ces dernières est moins importante que sur les bactéries à Gram positif. (Coma *et al*, 2003; No *et al*, 2003)

##### **I.2.5.1.1 2 Activité antifongique du chitosane**

Laflamme *et al*, (2000) ont montré que l'utilisation du chitosane à partir d'une concentration de 1 g/l réduit considérablement la croissance des souches fongiques suivante : *Cylindrocladium floridanum*, *Cylindrocarpon destructans* et *Fusarium oxysporum*. Torr *et al*, (2005) ont montré que le chitosane a un effet antifongique contre *Leptographium procerum* et *Sphaeropsis sapinea* à partir d'une concentration de 0,3 % (m/V). Roller et Covill (1999) ont étudié l'action du glutamate de chitosane sur la croissance d'*Aspergillus flavus*, de *Cladosporium cladosporioides*, de *Mucor racemosus*, de *Penicillium aurantiogriseum* et de *Saccharomyces cerevisiae*, dans le jus de pomme. L'obtention d'une action inhibitrice contre toutes ces souches a nécessité une concentration de chitosane de 5 g/L.



### **I.2.5.1 Mode d'action du chitosane**

Le mécanisme d'action du chitosane contre les bactéries et les souches fongiques est jusqu'à aujourd'hui mal connu. Cependant, il existe plusieurs éléments qui peuvent expliquer cette action :

- La formation de liaisons électrostatiques entre les charges positives du chitosane (transformation des fonctions  $\text{NH}_2$  du chitosane en fonctions  $\text{NH}_3^+$  en milieu acide) et les phospholipides de la membrane cellulaire qui ont une charge négative, perturbant ainsi les échanges entre la cellule microbienne et le milieu extérieur; (Devlieghere et *al*, 2004; Peng et *al*, 2005; Yang et *al*, 2005)
- L'inhibition peut aussi être due à l'enrobage des cellules microbiennes par le chitosane, éliminant ainsi tout échange avec le milieu extérieur (Muzzarelli et *al*, 2001).
- La formation de liaisons entre le chitosane et l'ADN des bactéries et l'inhibition de la synthèse du ARNm (Devlieghere et *al*, 2004).
- Le chitosane peut aussi agir de façon indirecte sur les bactéries et les moisissures, et cela par complexation des métaux nécessaires pour leur croissance (Roller and Covill 1999).

### **I.2.5.2 Activité du chitosane en fonction des paramètres abiotiques**

Comme cela a été souligné précédemment, les deux paramètres qui caractérisent le chitosane sont le degré de déacétylation et la masse moléculaire, d'ailleurs son activité antimicrobienne en dépend beaucoup. Cependant il existe d'autres éléments qui influencent l'activité du chitosane.

L'action du chitosane est maximale à des pH faibles compris entre 6 et 6,5 puisque c'est dans cette zone où les groupements  $\text{NH}_2$  sont protonés (le chitosane n'est soluble que dans des acides dilués). Cependant, à des pH plus faibles (entre 1 et 4) l'activité du chitosane diminue. Ceci est dû à la compétition entre les protons et les groupes ammonium (Chung et *al*, 2003) vis-à-vis des cellules microbiennes.

Il a été montré que la masse moléculaire a également une influence sur l'activité antimicrobienne du chitosane. Cependant, une règle générale définissant cette influence ne peut être établie, car elle varie différemment d'un organisme à un autre. Ainsi, un chitosane avec une masse moléculaire élevée semble plus efficace contre les bactéries Gram négatif, que contre les bactéries Gram positif (No et *al*, 2002). De plus, au sein du même type de bactérie, cette influence peut varier. Par exemple, avec *Escherichia coli*, bactérie Gram négatif, l'activité augmente avec la masse moléculaire jusqu'à un certain niveau ( $9,16 \cdot 10^4$  g/mol) puis elle diminue, car avec l'augmentation de la masse moléculaire, il y a plus

d'interaction intramoléculaire entre les groupes ammonium et les groupes hydroxyle du chitosane ce qui les rendent indisponibles. (Fei Liu et *al*, 2001; Liu et *al*, 2006).

L'action du chitosane sur les bactéries Gram négatif est limitée par la présence de leur membrane externe, mais son association à l'EDTA augmente son efficacité, car l'EDTA s'adsorbe (complexation des  $Mg^{2+}$  et  $Cu^{2+}$ ) à cette membrane externe augmentant ainsi sa perméabilité (Chung et *al*, 2003). La présence des métaux comme  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  diminue l'activité antimicrobienne du chitosane, car ce dernier complexe ces métaux (Chung et *al*, 2003), c'est d'ailleurs, ce caractère qui est mis à profit dans le traitement des eaux usées.

### **I.2.5.3 Exemples d'utilisation du chitosane**

L'aspect biocompatible et non-toxique du chitosane a permis son utilisation dans la fabrication de peau artificielle (Di Martino et *al*, 2005) et dans la médecine vétérinaire (Şenel and McClure 2004).

Le chitosane a été aussi employé pour stimuler les défenses naturelles des plantes. Ainsi la pulvérisation des vignes par le chitosane augmente la production des chitinases, des  $\beta$ -1,3-glucanases (qui dégradent la paroi des moisissures) et de la biosynthèse de composés phénoliques qui agissent comme antimicrobiens (Amborabe et *al*, 2004).

Il a aussi été utilisé pour la fabrication de textiles ayant des propriétés antimicrobiennes. (El-Tahlawy et *al*, 2005; Ye et *al*, 2005)

La similitude qui existe entre le chitosane et la cellulose au niveau structural a permis son utilisation comme agent de couplage dans les composites bois-plastiques (Shah et *al*, 2005). Eikenes et *al*, (2005) ont montré que le chitosane peut être utilisé comme produit de préservation du bois contre *Poria placenta* et *Coniophora puteana*. Un autre aspect de l'utilisation du chitosane, consiste en l'enrobage des fruits, tel le litchi, pour leur permettre de garder coloration et saveur (Jiang et *al*, 2005).

Toutefois, il existe des limitations pour l'utilisation du chitosane dans l'emballage. En effet, il est sensible à la vapeur d'eau en raison de sa capacité à former un grand nombre de liaisons hydrogène (deux fonctions hydroxyles et une fonction amine par motif de répétition) et il est également dur ou cassant. Par ailleurs, du point de vue économique, le prix de ce matériau est relativement élevé malgré sa fabrication à partir de déchets industriels.

Pour pallier ces inconvénients, quelques stratégies ont été mises en place comme la modification chimique du chitosane ou l'association du chitosane avec d'autres polymères biodégradables issus des ressources renouvelables (pectine, cellulose, amidon) ou avec des



polymères d'origine pétrochimique: poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), poly (hydroxy butyrate) (PHB) et poly (hydroxy butyrate-co-valérate) (PHBV), ou par l'ajout d'un plastifiant.

### **I.3 Les emballages antimicrobiens**

#### **I.3 1 Les agents antimicrobiens alimentaires**

Certains conservateurs alimentaires chimiques, tels que le sel, les nitrites et les sulfites, ont été utilisés depuis de nombreuses années. Récemment, ces conservateurs chimiques ont vu leurs utilisations réduites au profit des conservateurs naturels (biopréservateurs) à la demande des consommateurs. Aujourd'hui ces agents conservateurs alimentaires antimicrobiens jouent un rôle important dans la protection, la conservation et l'approvisionnement alimentaire.

##### **I.3 1 2 L'incorporation des agents antimicrobiens dans un emballage ou enrobage comestible**

Le but de l'incorporation des substances antimicrobiennes dans un emballage est d'empêcher la croissance microbienne en surface des aliments. La libération progressive d'un agent antimicrobien à travers un film d'emballage vers la surface d'un aliment peut avoir un avantage par rapport aux techniques de trempage et de pulvérisation. L'inconvénient des techniques de trempage ou de pulvérisation des agents antimicrobiens est que l'activité antimicrobienne de ces derniers peut être perdue rapidement par évaporation ou par migration dans la matrice alimentaire. Les émulsifiants et les acides gras, par exemple, sont connus pour interagir avec la nisine réduisant ainsi son activité biologique dans le produit (Henning et *al*, 1986; Jung et *al*, 1992). Vojdani et Torres (1989) ont constaté que les sorbates sont rapidement absorbés à la surface des aliments annulant ainsi leur effet protecteur alors que leur incorporation dans des films de polysaccharide a permis de les protéger. Les films permettant une diffusion lente sont souhaitables car ils permettent de maintenir des concentrations en surface plus élevées pendant de plus longues périodes (Devlieghere et *al*, 2004) La diffusion des agents antimicrobiens à travers les emballages a fait l'objet de plusieurs publications (Park et *al*, 2004; Min et *al*, 2005; Rojas-Graü et *al*, 2009). Les matériaux d'emballage antimicrobiens doivent être en contact avec la surface des aliments principalement dans le cas où les agents antimicrobiens sont non-volatils. Ainsi, ils peuvent se répandre sur la surface du produit et s'y diffuser si nécessaire. Selon Han (2000), l'avantage des agents antimicrobiens volatils est qu'ils peuvent être libérés à la surface de la matrice alimentaire sans que le polymère ne soit directement en contact avec le produit.

### **I.3.3 Quelques molécules naturelles utilisées dans la conservation des aliments**

Des moyens naturels pouvant directement agir sur l'aliment comme les acides carboxyliques et leurs sels (acétique, propionique, lactique, benzoïque), les enzymes comme le lysozyme, des molécules complexes capables de fixer le fer indispensable à la croissance de certains microorganismes (lactoferrine, sidérophores, *etc.*), ou certaines molécules biologiquement actives comme les bactériocines, sont étudiés, et pour certains déjà appliqués industriellement pour lutter contre les contaminants microbiens indésirables ou pathogènes des aliments.

#### **I.3.3.1 Les acides carboxyliques et leurs sels**

Les acides carboxyliques saturés et leurs sels les plus couramment utilisés en tant qu'agents de conservation sont : l'acide formique ( $\text{H-COOH}$ ) et le formiate ; l'acide acétique ( $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ), l'acétate et le diacétate; et l'acide propionique ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ) et propionate. Ces acides, ajoutés ou libérés par un processus de fermentation *in situ* dans le produit alimentaire, ont un rôle antibactérien du fait de l'acidification du milieu. Le diacétate est un inhibiteur de moisissures et de *Bacillus* intéressant en boulangerie. L'acide propionique à 1%, protège les fromages à pâte cuite contre l'attaque des moisissures (Bourgeois and Larpent 1996).

Au niveau des acides carboxyliques insaturés, l'acide sorbique ( $\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CHCOOH}$ ) et ses sels sont de bons fongistatiques, à condition que les concentrations ne soient pas trop élevées, sinon, le sorbate devient une source en carbone métabolisable (Bourgeois and Larpent 1996). L'action antimicrobienne de cet acide est due à l'inhibition des déshydrogénases. L'acide sorbique et ses sels ne présentent aucun effet toxique. En ce qui concerne les acides carboxyliques aromatiques, l'acide benzoïque est surtout actif à pH inférieur à 4 sous sa forme non dissociée. Son mode d'action est encore mal connu, mais son spectre d'inhibition est surtout dirigé contre la croissance des levures (Bourgeois and Larpent 1996). L'acide benzoïque est peu soluble dans l'eau et ce sont surtout ses sels : benzoates de sodium, de potassium ou de calcium et ses esters méthyliques et propyliques qui sont les plus utilisés. Ces sels présentent une toxicité à forte dose, ils peuvent élever les besoins en rétinol (vitamine A). L'acide lactique et l'acide malique sont également des conservateurs organiques ne présentant pas de toxicité.

### **I.3.3 2 Les bactériocines**

Les bactériocines sont définies comme des molécules de nature protéique, synthétisées par voie ribosomique et douées d'une activité bactéricide ou bactériostatique. Parmi leurs caractéristiques communes, ces molécules sont synthétisées dans la cellule sous forme de polypeptides ou de précurseurs de polypeptides (Cenatiempo et *al*, 1996). Le spectre d'activité est plus ou moins large, quelques fois limité aux espèces phylogénétiquement proches des bactéries productrices. Parmi les bactéries lactiques productrices, sont recensés les lactobacilles, les lactocoques, les pédiocoques, les leuconostocs et les carnobactéries (Jack et *al*, 1996).

La nisine produite par *Lactococcus lactis spp lactis*, est la plus étudiée. Elle est utilisée en tant qu'agent de conservation (E234) dans l'industrie alimentaire. Ce peptide a montré une grande efficacité contre les bactéries à gram positif telles que *L. monocytogenes*, mais son efficacité est moindre contre les bactéries à gram négatif telles que *E. coli*. (Zhang and Mustapha 1999) Il existe également une autre bactériocine, la Natamycine ou Pimaricin ou E235, active contre presque toutes les moisissures et levures, mais qui n'a aucun effet sur les bactéries ou les virus. Les bactériocines ne sont pas toxiques mais comme tous les antibiotiques, elles peuvent créer des souches résistantes.

### **I.3.3 3 Les enzymes**

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques capables de réaliser la plupart des réactions biochimiques avec une efficacité extraordinaire.

Les enzymes les plus utilisées dans la conservation des aliments sont le lysozyme et la lactoperoxydase.

### **I.3.3 4 Les lysozymes**

Ces enzymes, présentes naturellement dans le lait et les œufs ont un fort potentiel dans la conservation des aliments en raison de leur stabilité. Ce sont des muramidases qui hydrolysent les liaisons  $\beta$ -1,4 entre l'acide N-acétylmuramique (M) et le N-acétyl glucosamine (G) du peptidoglycane des membranes cellulaires. Toutefois, son efficacité antimicrobienne limitée contre les bactéries gram négatif restreint son application dans l'industrie alimentaire (Masschalck and Michiels 2003). Une action des lysozymes, couplée à des agents de chélation tels que l'EDTA permet de déstabiliser la membrane externe des bactéries à gram-négatif. Le lysozyme est également actif sur les spores de *Clostridium*.

### **I.3.3 5 Le système lactoperoxydasique (LPOS)**

Le système lactoperoxydase (LPOS) est un système antimicrobien présent dans le lait. Il a été proposé de l'utiliser pour aider à la stabilisation du lait cru dans les zones où il est impossible d'utiliser la réfrigération pour des raisons technique et économique (Naidu 2000; Loiseau et *al*, 2001). Il s'agit d'un système antimicrobien qui se compose de trois éléments : l'enzyme lactoperoxydase, le thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

### **I.3.4 Les composants**

#### **I.3.4.1 La lactoperoxydase**

La lactoperoxydase (LPO, EC : 1.11.1.7) est, après la xanthine oxydase, l'oxydase la plus abondante dans le lait de vache. Présente à des concentrations de l'ordre de 10 à 30  $\text{mg.L}^{-1}$ , elle constitue environ 1 % des protéines du lactosérum (Reiter and Harnulv 1984). C'est une glycoprotéine cationique de 78,5 kDa formée d'une chaîne polypeptidique de 612 acides aminés, comportant 10 % de groupements carboxyles (Dull et *al*, 1990; Kussendrager and Hooijdonk 2000). Son point isoélectrique est égal à 9 (Marcozzi et *al*, 1998). Environ 12 % de sa structure est non organisée, 23 % organisée en hélice  $\alpha$  et 65 % en hélice  $\beta$ .

Le groupement hème représente le centre catalytique de la molécule. Un ion  $\text{Ca}^{2+}$  est lié à la molécule et semble avoir une importance dans la stabilité de la conformation de l'enzyme. Le résidu histidine, présent au centre de la molécule, sert de lien avec l'atome de fer du noyau et participe au transfert d'électrons lors des réactions avec l'ion thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ) et l'ion iode ( $\text{I}^-$ ) (De Wit and Van Hooydonk 1996).

La lactoperoxydase est l'une des enzymes du lait la plus thermorésistante (Griffiths 1986). Sa dénaturation est possible à des températures supérieures à 73 °C (de Witt et van Hooydonk, 1996). Une pasteurisation de 2 sec à 72°C en tampon acétate provoque une perte d'activité de 34 % ; une perte totale d'activité est observée lorsque le temps de chauffage à 72°C durant 2 min. Dans le lait cru, dans les mêmes conditions de chauffage de 2 sec et 2 min à 72°C, une perte d'activité respectivement 2 et 15 % seulement est enregistrée et une dénaturation totale est obtenue pour un chauffage à 76°C durant 2 min (De Wit and Van Hooydonk 1996). Elle est totalement inactivée après un traitement du lait cru à 80°C durant 15 sec (Barrett and Lewis 1999). L'activité optimale de la lactoperoxydase est observée à des valeurs de pH comprises entre 5,0 et 6,5 (Reiter and Harnulv 1984; Martin-Hernandez et *al*, 1990). En présence de NaCl, le pH optimum se situe entre 3,4 et 5,0 (Sanchez 1990).

Le substrat privilégié de la lactoperoxydase est l'ion thiocyanate. Cette enzyme peut également oxyder d'autres halogénures tels que l'ion bromure ( $\text{Br}^-$ ), l'ion chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) ou



l'ion iodure ( $I^-$ ) (Revol-Junelles et *al*, 2001; CAILLIEZ-GRIMAL et *al*, 2002). Carlsson (1983) a déterminé les vitesses de réaction en présence des différents substrats par un suivi de la disparition d' $H_2O_2$ . La réaction est beaucoup plus rapide en présence de  $I^-$  que de  $Br^-$ . Le pH optimum en présence de  $SCN^-$  ou de  $Br^-$  est de 4,5 et de 6,8 en présence de  $I^-$  (Ferrari et *al*, 1995).

#### **I.3.4.2 Le thiocyanate**

Comme la LPO, le thiocyanate est naturellement présent dans les tissus et les sécrétions des mammifères (lait, salive, sécrétions thyroïdiennes). Dans le lait, les concentrations en thiocyanate varient selon le type d'animal (4,5 ppm pour la chèvre et jusqu'à 10 mg.kg<sup>-1</sup> pour la vache), son alimentation et la période de lactation (Zapico et *al*, 1991). Les deux sources majeures de thiocyanate sont les glucosinolates et les glucosides cyanogéniques. Les plantes du genre *Brassica* (famille des crucifères) telles que le chou, les céréales, comme le maïs, ou encore les pommes de terre en sont particulièrement riches (Wolfson and Sumner 1993).

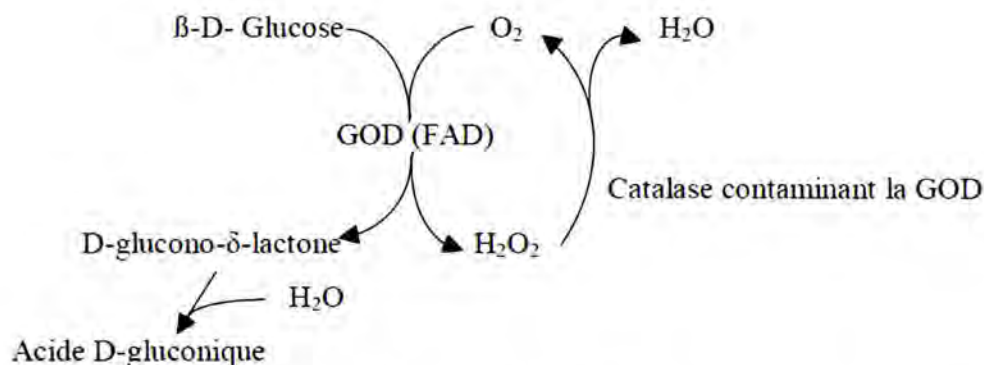
#### **I.3.4.3 Le peroxyde d'hydrogène**

Le peroxyde d'hydrogène est un agent stérilisant, fortement toxique. Il est capable d'inactiver les enzymes par oxydation d'acides aminés. L'inconvénient majeur de son utilisation dans les aliments est dû au fait qu'il est à l'origine d'altérations, de flaveurs oxydées et de phénomènes de blanchiment.

Il est donc primordial de parvenir à libérer le peroxyde d'hydrogène à un flux faible et constant tout en le maintenant à un seuil de concentration tel que l'enzyme puisse produire l'anion hypothiocyanite en concentrations suffisantes. Une alternative intéressante à l'ajout de peroxyde d'hydrogène consiste en l'utilisation d'un système enzymatique générateur d' $H_2O_2$  de type glucose oxydase/glucose (Wolfson and Sumner 1993). La libération progressive du peroxyde par le système glucose oxydase/glucose permet le maintien de l'activité lactoperoxydasique dans le temps

La glucose oxydase ( $\beta$ -D glucose oxygène 1-oxydoréductase, GOD) appartient à la famille des oxydo-réductases (EC.1.1.3.4). Elle est active sur une gamme de pH comprise entre 4 et 7, avec un optimum à pH 5,5 (Haouz et *al*, 2001).

La GOD catalyse l'oxydation du D-glucose en présence d'oxygène en  $\delta$ -gluconolactone secondairement transformée en acide gluconique. Cette réaction s'accompagne de la libération d' $H_2O_2$  (Figure 6).



**Figure 6:** Réaction d'oxydation du glucose en présence d'oxygène catalysée par la GOD (Wolfson and Sumner 1993).

En solution, la GOD perd rapidement son activité entre 30 et 40°C pour être totalement inactive à 50°C ; une partie de l'activité est retrouvée si l'enzyme est placée à température ambiante. Cette activité résiduelle diminue lorsque la température augmente et disparaît à 70°C. La dénaturation thermique de la GOD est en relation avec le pH de la solution. Plus l'enzyme est active, plus sa dénaturation thermique est faible. C'est donc au pH optimum de l'enzyme que la dénaturation sera la plus faible.

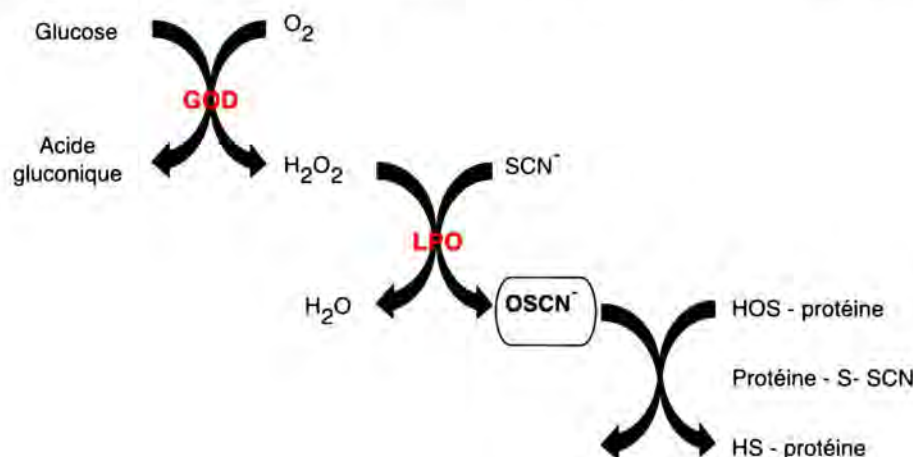
L'immobilisation de l'enzyme est souvent employée pour améliorer la thermotolérance de la GOD.

### I.3.5 Le fonctionnement du système Lactoperoxydase

Les premières hypothèses sur le mode d'action du système ont été émises après la mise en évidence du pouvoir antibactérien de l'hypothiocyanite. L'activité du LPOS a été testée sur des cellules d'*Escherichia coli* sauvages et des cellules dont la membrane était altérée par action de l'EDTA ou par un choc osmotique. L'altération de la membrane favorisant l'action du système, la localisation du site d'action de OSCN<sup>-</sup> a été supposée être au niveau de la membrane plasmique (Thomas and Aune 1978).

Les études suivantes ont montré que le LPOS agit par le biais de dommages membranaires et par l'inhibition d'enzymes cytoplasmiques. Ces dommages sont dus à la fixation de l'hypothiocyanite aux groupements SH libres des protéines membranaires et des enzymes clés du métabolisme (Figure 7). La fixation de l'OSCN<sup>-</sup> entraîne une modification du gradient de pH et une fuite d'ions potassium et d'acides aminés. Il en résulte une perturbation des activités cellulaires faisant intervenir des protéines, une inhibition de la chaîne respiratoire et un dérèglement de la synthèse d'ADN et d'ARN (Reiter and Perraudin 1991; Kussendrager and Hooijdonk 2000).

Les effets du système sur le métabolisme bactérien incluent la réduction de la prise d'oxygène (Oram and Reiter 1966), la réduction de la production du lactate par les micro-organismes fermentants (Tenovuo et *al*, 1981), l'inhibition d'enzymes clés du métabolisme telles que l'hexokinase et la glycéraldéhyde-3P-déshydrogénase (Marshall and Reiter 1980) l'inhibition de la prise de glucose, l'altération de la membrane cytoplasmique avec libération d'ions potassium, d'acides aminés et de polypeptides (Marshall and Reiter 1980).



**Figure 7:** Mode d'action du système Lactoperoxydase complet (Thomas and Aune 1978).

Les produits finaux de l'oxydation du thiocyanate par la LPO dépendent de la méthode utilisée pour produire le peroxyde d'hydrogène ainsi que de la proportion relative en substrats (Dionysius et *al*, 1992). Lorsque l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est formé par le système enzymatique, le rapport stoechiométrique  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{SCN}^-$  assure que l' $\text{OSCN}^-$  est le principal produit d'oxydation formé. Aujourd'hui, le mécanisme d'action exact du système n'est toujours pas parfaitement élucidé, son efficacité dépendant de la concentration de substances antibactériennes produites, des substrats employés et du mode de génération du peroxyde d'hydrogène.

La peroxydation du  $\text{SCN}^-$  par la lactoperoxydase est réalisée suivant 3 cycles différents qui dépendent des concentrations en  $\text{SCN}^-$  et en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Tableau 3).

**Tableau 3:** Conséquences des concentrations initiales des substrats sur l'activation de la LPO

Conditions	Conséquences
[SCN <sup>-</sup> ] suffisante	Activation optimale
[SCN <sup>-</sup> ] > 0,3 $\mu\text{M}$	Inactivation réversible de la LPO
Excès d' $\text{H}_2\text{O}_2$ (> 0,5 mM)	Inactivation irréversible de la LPO



### **I.3.5.1 Activités antimicrobiennes**

En plus de l'activité antibactérienne, l'activité inhibitrice du LPOS a été rapportée contre les virus (Pourtois et *al*, 1990), les mycoplasmes (Reiter et *al*, 1981), les que levures et moisissures (Cailliez-Grimal et *al*, 2002).

#### **I.3.5.1.1 Activités antibactériennes**

Il semble que la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives soit un obstacle plus grand à l'action de l'ion hypothiocyanite que ne l'est la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives. Les résultats (Tableau 4) sont variables selon le système de production de l' $H_2O_2$  et selon les différentes conditions expérimentales (milieu de culture, température d'incubation, pH).

#### **I.3.5.1.2 Effet antifongique du système lactoperoxydase**

La capacité du système LPOS à dégrader les aflatoxines en présence de chlorure de sodium (225 mM) et  $H_2O_2$  (50 mM) a été rapportée (Doyle and Marth 1978). L'augmentation de la quantité du LPOS de 50 à 500 unités/mL de mélange réactionnel conduit à augmenter le taux de dégradation de l'aflatoxine B1 de 3,6 à 5,1%/24 h. Son activité antifongique contre diverses souches fongiques des fruits tropicaux a été démontrée (Le Nguyen et *al*, 2005; Ducamp-Collin et *al*, 2006; Sagoua 2009)

Popper et Knorr (1997) ont montré une activité antifongique du LPOS avec la glucose oxydase dans la solution du jus de pomme

Le système LPO-thiocyanate- $H_2O_2$  du lait de chèvre permettait d'inhiber la croissance et la prolifération de nombreuses espèces fongiques à savoir, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma spp*, *Corynespora cassicola*, *Phytophthora meadii* et *Corticium salmonicolor*. Cependant, *Candida albicans* et *Pythium* n'ont pas été affectés par le système (Jacob et *al*, 2000).

#### **I.3.5.1.3 Effet antiviral du système lactoperoxydase**

Il a été montré que la lactoperoxydase pouvait inactiver le poliovirus et le virus de vaccina, en présence d'halogénures ( $I^-$ ,  $Br^-$ ) comme donneurs d'électrons (Belding et *al*, 1970). Ces virus particuliers sont plus résistants que les autres, aux effets du séchage, de la chaleur, et des désinfectants. Yamaguchi et *al*, (1993) ont rapporté que la LPO et la glucose oxydase sont virucides contre le VIH-1 en présence d'iodure de sodium en conduisant à la perte de la réplication virale dans le syncytium ou par l'inhibition des effets cytopathiques sur les cellules infectées. Ces résultats in vitro montrent que le système LP/ $H_2O_2$ /halide fournit de puissantes activités virucides contre le VIH-1. D'autre part, Pourtois et *al*, (1990) ont rapporté que le VIH qui a été traité avec  $OSCN^-$  généré par le système composé de glucose / glucose



oxydase / thiocyanate / lactoperoxydase après 30 sec produit très peu de protéine et aucune quantité détectable de cette protéine pourrait être trouvée après 2 min de traitement.

**Tableau 4:** Comparaison des différentes concentrations des composants du LPOS utilisés dans la littérature (Adolphe 2006).

Références	[GOD]	[LPO]	[Glucose] g.l <sup>-1</sup>	[SCN-] Mg.l <sup>-1</sup>	pH	Milieux	Températures (°C)	Souches	Effet antibactérien
(Denis and Ramet 1989)	2 mg.l <sup>-1</sup> (282 UI.l <sup>-1</sup> )	20 mg.l <sup>-1</sup> (800 UI.l <sup>-1</sup> )	2,6	25	6,6	Lait	4 et 15	<i>L. monocytogenes</i>	Bactériolytique
(Dionysius et al, 1992)	100 UI.l <sup>-1</sup>	14000 UI.l <sup>-1</sup>	3,2	2,4 ou 224	NP	Peptone-Extrait de levure	37	<i>E. coli</i>	Bactériolytique
(Kennedy et al, 2000)	984 UI.l <sup>-1</sup>	19 mg.l <sup>-1</sup>	3,96	NP	7,8	THB	0,6 et 12	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogène</i> <i>S. aureus</i>	Bactériolytique
(Bosch et al, 2000)	100 UI.l <sup>-1</sup>	30 mg.l <sup>-1</sup>	19,59	100	5,0	TSA	35	<i>Candida albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>Paeruginosa</i> , <i>S.aureus</i>	Bactériostatique
(Boussouel et al, 2000)	112,5 UI.l <sup>-1</sup>	5040 UI.l <sup>-1</sup>	0,2	25	6,4	Lait	25	<i>L. monocytogenes</i>	Bactériostatique
(Revol-Junelles et al, 2001)	42 UI.l <sup>-1</sup>	4970 UI.l <sup>-1</sup>	0,2	12,5	6,4	Lait	25	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>E. coli</i>	Bactériostatique Bactériostatique - -
(McLay et al, 2002)	Activité de la LPO/11,9	187,5 mg.l <sup>-1</sup>	4,17	500	7,8	THB	37	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Bactériostatique Bactériolytique

### **I.3.6 Applications et utilisations du système lactoperoxydasique**

Des essais effectués sur le lait ont montré l'efficacité du système lactoperoxydase dans la régression d'une contamination due à *Pseudomonas sp.*, à *E. coli sp.* et à *Salmonella typhimurium*. L'action du LPOS est très efficace dans l'augmentation de la conservation des crèmes glacées et des crèmes pâtisseries (Perraudin, 1991). D'autres essais ont porté sur l'efficacité de ce système pour la protection de la surface des fromages à pâte molle (Denis et Ramet, 1989).

Par ailleurs, Langley-Danysz (1989) a observé que l'activation de la peroxydase salivaire réduisait l'apparition des caries, de paradontites et de la formation de la plaque dentaire, ce qui a conduit la société Colgate-Palmolive à incorporer le système dans du dentifrice.

La FAO a investi dans la recherche de la conservation du lait cru dans les pays en voie de développement par système lactoperoxydasique. Plusieurs brevets ont été déposés sur l'utilisation du LPOS par exemple en médecine, pour le traitement *in vivo* des infections à *Helicobacter pylori* ou dans des pesticides, pour contrôler les populations de micro-organismes pathogènes. Le nombre d'applications potentielles de ce système ne cesse de s'accroître. Des travaux ont montré que l'emploi du LPOS en aquaculture permet de réduire la mortalité d'environ 30 % lors du sevrage des jeunes poissons (van Hooijdonk et al, 2000).

Grâce à toutes ces études, l'association LPO/GOD/glucose/SCN<sup>-</sup> est considérée par le *Codex Alimentarius* comme auxiliaire technologique, en tant qu'agent de lutte contre les microorganismes (CAC/GL 13-1991). Un avis de l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), daté du 2 juin 2003, a autorisé l'emploi du système lactoperoxydasique comme auxiliaire technologique pour le traitement des salades de la IV<sup>ème</sup> gamme.

### **I.4 Immobilisation d'enzyme dans un Emballage**

Il existe un certain nombre de problèmes pratiques dans l'utilisation d'enzymes à savoir l'instabilité de leurs structures une fois qu'elles sont isolées de leur milieu naturel, et leur sensibilité aux conditions de process autres que celles optimales. Pour surmonter ces problèmes, l'une des méthodes les plus sûres reste l'immobilisation des enzymes sur un support (Krajewska 2004; Cowan and Fernandez-Lafuente 2011; Lian et al, 2012)

L'immobilisation est réalisée en fixant des enzymes à ou/avec des supports solides. Ainsi, par rapport aux enzymes libres en solution, les enzymes immobilisées sont plus robustes et plus résistantes aux changements environnementaux.

L'immobilisation implique cependant un certain nombre d'effets négatifs sur la performance des enzymes. Par rapport à l'enzyme libre, le plus souvent l'enzyme immobilisée voit son activité baisser et sa constante de Michaelis augmenter. Ces altérations résultent de modifications structurales introduites au niveau de l'enzyme par la procédure d'immobilisation appliquée et de la création d'un microenvironnement dans lequel l'enzyme fonctionne, différente de son milieu naturel.

Le choix d'une technique d'immobilisation dépend de l'application finale donnée à l'enzyme. La liaison covalente de l'enzyme à la matrice est généralement la technique d'immobilisation la plus stable. La capacité de la matrice ou la technique de liaison, ainsi que la stabilité mécanique et chimique de la matrice, son coût, la difficulté de l'activation du support sont aussi importants dans le développement d'un système d'enzyme immobilisée. Il faut remarquer qu'il n'existe pas «de technique idéale» (Bowers 1986).

#### **I.4.1 Techniques d'immobilisation**

Les enzymes peuvent être immobilisées soit par rétention physique, soit par liaison chimique (Figure 8). On peut aussi combiner les deux méthodes pour assurer une meilleure fixation de l'enzyme. La rétention physique exploite la grande différence de taille entre l'enzyme et le substrat, d'où l'idée de créer une barrière semi-perméable pour retenir l'enzyme. Elle peut être un réseau, une capsule ou une membrane. La liaison chimique entre l'enzyme et le support se réalise soit par simple interaction ionique (adsorption), soit par création d'une vraie liaison covalente (fixation covalente sur support activé et coréticulation). L'immobilisation chimique présente souvent l'avantage de stabiliser la protéine et de permettre une utilisation prolongée (Weetall 1974).

Les principales méthodes d'immobilisation sont :

**1-** L'adsorption physique : elle se réalise sur des supports inertes (verres, cellulose, charbon actif). La fixation se fait par interaction des groupes fonctionnels de l'enzyme et du support (liaison hydrogène, forces de Van der Waals, interaction ionique...). Cette adsorption exige des conditions de pH et de force ionique très précises. La



moindre variation d'un de ces paramètres provoque une désorption, inconvénient majeur de cette technique.

**2-** La fixation sur échangeur d'ions : les enzymes sont porteuses de charges. Elles peuvent donc se lier avec des échangeurs d'ions par liaison électrostatique. Il existe différents types d'échangeurs :

- des échangeurs cationiques : Carboxyméthyl Cellulose
- des échangeurs anioniques : Diéthylaminoéthyl Cellulose

Cette fixation est réversible, les conditions opératoires, principalement pH et force ionique, ne doivent pas varier sous peine de désorption.

**3-** L'inclusion dans un gel : l'enzyme est emprisonnée à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une matrice. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme et permet la diffusion du substrat.

**4-** La liaison covalente avec le support : une liaison est établie entre un groupement fonctionnel de l'enzyme et un groupement fonctionnel du support préalablement activé (tableau 5).

**5-** La réticulation et la co-réticulation : le procédé consiste à associer l'enzyme et une protéine de charge à l'aide d'un agent bi ou multifonctionnel. Le complexe formé possède une masse moléculaire élevée et est insoluble. Le plus souvent, la protéine de charge est l'albumine du sérum bovin (BSA) et l'agent réticulant le glutaraldéhyde ou sa forme polymérisée. La forme polymérisée résulte d'une condensation aldolique avec perte d'eau. Cet agent bifonctionnel possède à ses extrémités deux groupements aldéhydes capables de réagir avec les fonctions amine des protéines.

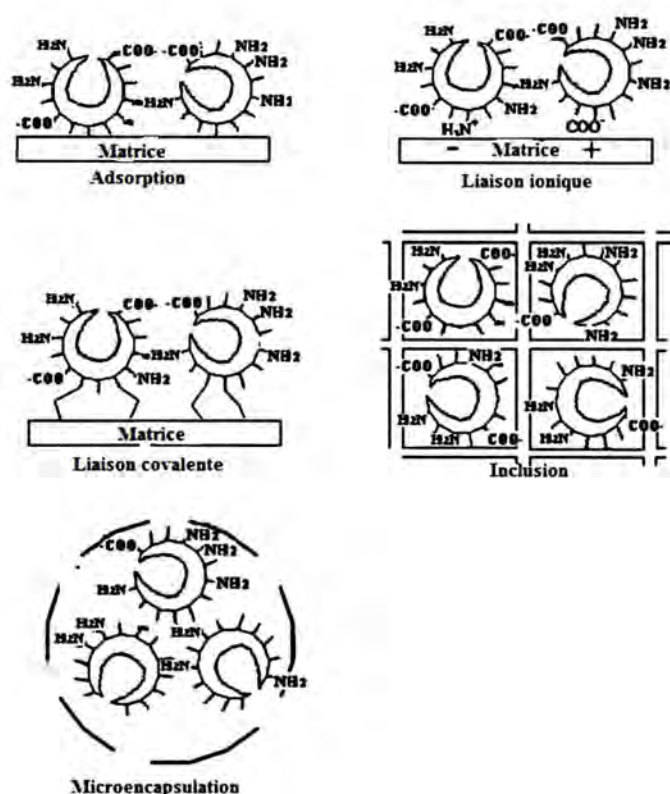


Figure 8: Schéma des méthodes d'immobilisation d'enzyme (Lian et al, 2012)

Tableau 5: Différents supports utilisés pour la fixation d'enzymes par la technique par liaison covalente

Substance organique		Groupes réactifs
Polyosides	Cellulose	OH
	Carboxyméthylcellulose (CMC)	$\text{COOH}$
	Diéthylaminocellulose (DEAE)	OH
	p-aminobenzylcellulose	$\text{NH}_2$
	Dérivé de la cellulose	OH
	Dextrans et agarose	$\text{CHO}$
	Amidon dialdéhyde	OH
	Anchranilates	$\text{COOH}$
Protéines	Collagène	$\text{NH}_2$ , $\text{COOH}$
Polymère synthétique	Polyaminoacide	$\varphi\text{NH}_2$ , $\text{COOH}$
	Éthylène anhydride maléique	anhydride
	Polyacrylamides	$\text{NH}_2$
	Copolymères d'acide méthacrylique	$\text{COOH}$
	Polystyrène et dérivés	$\varphi\text{-X}$
	Polyamides	$\text{NH}_2$
Substance minérales	Verre poreux	OH
	Alumino-silicates	OH
	Oxyde métalliques	OH
Support s mixtes	Supports magnétiques	Variable
	Support organo-minéraux	variable

#### **I.4.1.1 Propriétés des enzymes immobilisées**

L'immobilisation des enzymes conduit souvent à un changement de leurs propriétés physiques, chimiques et cinétiques.

##### **I.4.1.1 Propriétés physico-chimiques**

Une des propriétés importantes et caractéristiques de l'immobilisation est l'amélioration de la stabilité dans le temps et de la résistance vis-à-vis de la dénaturation. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend beaucoup du microenvironnement imposé par le support. Ainsi, les enzymes fixées par liaison sulfonamide sont moins stables que celles fixées par liaison azote.

##### **I.4.1.1.1 Propriétés cinétiques**

L'immobilisation des enzymes affecte beaucoup leurs propriétés cinétiques. En effet, à la vitesse de réaction enzymatique proprement dite, il faut ajouter l'effet du microenvironnement qui conditionne toute l'activité catalytique. Ainsi, les phénomènes de diffusion limitent l'accès du substrat au niveau du site enzymatique. Ceci a pour conséquence une variation de la vitesse maximale  $V_m$  et de la constante de Michaelis  $K_m$  de l'enzyme. De même, le pH de l'enzyme peut être modifié, en particulier lorsque la réaction enzymatique met en jeu une libération ou une consommation de protons.

##### **I.4.1.2 Relation enzyme - support**

Les propriétés des enzymes immobilisées sont régies par les propriétés de l'enzyme et du support solide (Kennedy and Cabral 1983; Tischer and Kasche 1999). L'interaction entre les deux donne une enzyme immobilisée spécifique avec des propriétés physico-chimiques et cinétiques qui peuvent être décisives pour son application pratique, et donc, un support judicieusement choisi peut améliorer considérablement les performances opérationnelles du système immobilisé. Bien qu'il soit reconnu qu'il n'y ait pas de support universel pour toutes les enzymes et leurs applications, un certain nombre de caractéristiques souhaitables devraient être communes à tout support considéré pour immobiliser les enzymes. Il s'agit notamment: d'une forte affinité aux protéines, de la disponibilité des groupes fonctionnels réactifs (Tableau 5) pour les réactions directes avec des enzymes et des modifications chimiques, d'hydrophilie, de la stabilité et la rigidité mécanique, de la capacité de régénération, et de la facilité de préparation dans différentes

configurations géométriques qui fournissent le système avec la perméabilité et la surface adaptée pour une biotransformation choisie. Naturellement, pour les produits alimentaires, pharmaceutiques, médicaux et agricoles, la non-toxicité et la biocompatibilité des matériaux sont également nécessaires. Par ailleurs, pour répondre à la sensibilisation croissante de la santé publique et de l'environnement, les supports doivent être biodégradables, et peu coûteux.

Parmi les nombreux supports qui ont été envisagés et étudiés pour immobiliser les enzymes, organiques ou inorganiques, naturels ou synthétiques, le chitosane est d'un intérêt dans le sens qu'il offre la plupart des caractéristiques (mentionnées) ci-dessus.

**Le chitosane** possède des propriétés chimiques et biologiques multiples (Peter 1995; Paul and Sharma 2000; Dutta et *al*, 2002). Dans ses chaînes polyglucosamines linéaires de haut poids moléculaire, le chitosane possède des groupes amino et hydroxyle réactifs se prêtant à des modifications chimiques (Peter 1995; Dutta et *al*, 2002). En outre, les groupes amino font du chitosane un polyélectrolyte cationique ( $pK_a \approx 6.5$ ), l'un des rares (existant) dans la nature. Cette basicité donne au chitosane des propriétés singulières : dissout dans une solution acide, le chitosane possède une haute charge positive sur les groupes  $-NH^{3+}$ , il adhère aux surfaces chargées négativement, forme des agrégats avec des composés polyanioniques et des chélates avec des ions de métaux lourds. La solubilité dans des solutions acides et l'agrégation des polyanions confère au gel de chitosane d'excellentes propriétés telle qu'une remarquable affinité aux protéines.

Comme support d'immobilisation d'enzymes, le chitosane est utilisé sous forme de poudres et de flocons qui donnent des gels. La préparation des gels de chitosane est favorisée par le fait que le chitosane se dissout facilement dans les solutions diluées de la plupart des acides organiques, dont l'acide formique, acides acétique, tartrique et citrique, pour former des solutions visqueuses qui précipitent avec une augmentation de pH et par la formation de complexes ionotropiques insolubles dans l'eau avec des polyélectrolytes anioniques. Les méthodes de préparation du gel de chitosane décrites dans la littérature peuvent être divisées en quatre groupes : la méthode d'évaporation du solvant, la méthode de neutralisation, la méthode de réticulation et la méthode de gélification ionotropique (Shahidi et *al*, 1999; Paul and Sharma 2000; Dutta et *al*, 2002).



## **1.5 Techniques de fabrication et d'application des films comestibles**

Plusieurs procédés peuvent être mis en œuvre pour la fabrication des films comestibles : l'extrusion pour les matériaux thermoplastiques, la fusion pour les lipides et l'étalement en couche mince « casting » pour les hydrocolloïdes (Guilbert et *al*, 1997).

Pour les films et enrobages comestibles à base d'hydrocolloïdes, les procédés de fabrication utilisés, souvent regroupés sous le terme de « voie humide », incluent :

- La coacervation simple, où un hydrocolloïde en dispersion aqueuse est précipité ou subit, un changement de phase par : évaporation du solvant, par une modification du pH, par un changement de la température ou encore par modification de la force ionique.
- La coacervation complexe, où deux solutions d'hydrocolloïdes de charge opposée sont combinées en provoquant l'interaction et la précipitation du complexe de polymères (e.g. l'association de protéines avec des chitosanes).
- La gélification ou la coagulation thermique, pour lesquelles le chauffage de la macromolécule entraîne sa dénaturation suivie d'une gélification (e.g. l'ovalbumine) ou d'une précipitation, ou encore le refroidissement d'une dispersion chaude d'hydrocolloïde provoque une transition sol-gel (la gélatine).

La fabrication des films et enrobages par « voie solvant » implique l'étalement en couche mince de la solution filmogène ou dispersion filmogène sur un support, suivi d'une étape d'élimination du solvant et de décollement. C'est pourquoi, cette voie est également dénommée « casting » ou « coulée continue » (Guilbert et *al*, 1997). Cette technique est le principal procédé appliqué pour la fabrication des films et enrobages à base de polysides et de protéines. Cette technologie, parfaitement maîtrisée à l'échelle du laboratoire, a été très largement utilisée pour étudier les propriétés filmogènes de nombreuses matières premières lipidiques, protéiques et polysidiques. Cette technique est aussi utilisée pour des productions industrielles

### **1.5.1 Influence de la formulation sur les propriétés filmogènes**

Pour pallier la formation de films cassants, des plastifiants sont ajoutés. Dans un premier temps, l'adjonction de plastifiant permet d'écarter les chaînes de polymères de manière à diminuer les forces intermoléculaires. L'incorporation de plastifiant variera essentiellement avec la tendance à la cristallisation. Son insertion dans la structure au niveau des espaces intermoléculaires modifie la géométrie du réseau et,

par conséquent, influe sur les caractéristiques du film. Ainsi, selon le plastifiant utilisé, on observera des variations dans la perméabilité de l'enrobage (Cao et *al*, 2009).

#### **I.5.1.1 Les plastifiants**

Ce sont des substances de faible volatilité utilisées au sein du film pour en modifier certaines propriétés physiques ou mécaniques, afin d'améliorer son étalement et de réduire sa fragilité.

Le plastifiant abaisse la température de transition vitreuse (passage d'un état cassant à un état caoutchouteux) du polymère. Ainsi, l'ajout d'un plastifiant est nécessaire pour surmonter la fragilité des films, pour améliorer la perméabilité et la flexibilité, et augmenter la résistance et l'adhésion du film à l'enrobage, et de les empêcher de se fissurer lors de l'emballage et le transport (Aydinli and Tutas 2000; Barreto et *al*, 2003). Ils peuvent être rajoutés dans la solution des polymères (technique de dispersion) ou après l'évaporation des solvants (technique d'absorption) (Santosa and Padua 1999).

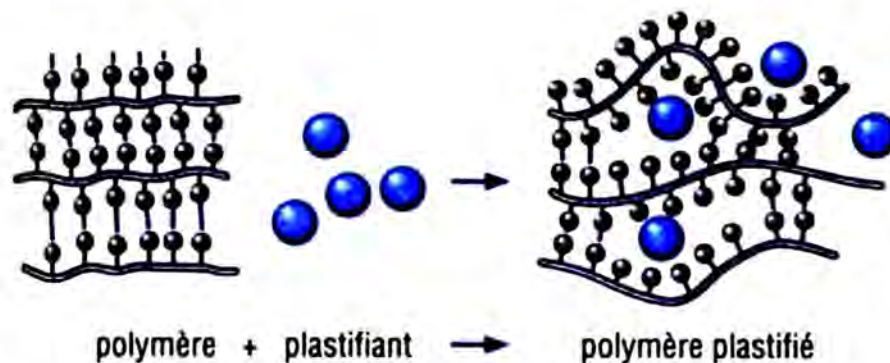
Les propriétés des plastifiants sont les suivantes :

- La compatibilité
- La solubilité du plastifiant
- La rémanence : elle représente la tendance que possède le plastifiant à rester au sein du polymère. Il ne faut pas dépasser un certain pourcentage de plastifiant, choisir des produits de poids moléculaires élevés de manière à éviter les pertes.

L'eau, les oligosaccharides, les polyols, et les lipides sont les différents types de plastifiants qui sont largement utilisés dans les films à base d'hydrocolloïdes (Suyatma et *al*, 2005).

Certaines théories ont été proposées pour expliquer les mécanismes de l'action des plastifiants (Di Gioia and Guilbert 1999; Verrier 2005):

- ✓ La théorie de la lubrification explique que le plastifiant, par insertion entre deux chaînes de polymères, réduit les interactions intermoléculaires.
- ✓ La théorie de gels laisse supposer que la rigidité d'un polymère provient d'une structure tridimensionnelle. Le plastifiant brise un certain nombre d'interactions intermoléculaires en masquant les centres de forces attractives et en solvant les chaînes de polymères en ces points (Figure 9).



**Figure 9:** Schématisation du mécanisme de plastification à l'échelle moléculaire

(Trotignon et *al*, 1996).

✓ La théorie du volume libre explicite le fait que, même à 0 K, le volume d'un cristal réel inclut des "trous" permettant des mouvements limités des éléments de la structure maillée. La plastification consiste alors à augmenter le volume libre en augmentant le nombre de chaînes et en facilitant le mouvement des chaînes principales. sur les différentes sources. Cette théorie explique l'abaissement de la température de transition vitreuse d'un polymère avec l'addition d'un plastifiant.

#### **I.5.1.2 Plastification du chitosane**

La plastification du chitosane a été peu étudiée en comparaison à celle de l'amidon ou des protéines. Néanmoins, certains auteurs ont démontré l'efficacité de quelques plastifiants pour les films de chitosane:

- ✓ des plastifiants hydrophiles: polyéthylèneglycol (PEG) (Alexeev et *al*, 2000; Caner et *al*, 2006), glycérol (Butler et *al*, 1996).
- ✓ des sucres: sorbitol et saccharose (Arvanitoyannis et *al*, 1997).

Butler *et al*, (1996) ont rapporté que l'élasticité des films de chitosane plastifié avec le glycérol diminue après 12 semaines de stockage, alors que Caner *et al*, (1998) ont trouvé que les films de chitosane plastifié avec le PEG sont stables jusqu'à 9 semaines. De ce fait, il est nécessaire de déterminer les taux de plastifiants et la stabilité pendant l'utilisation ou le stockage afin de connaître l'efficacité d'un plastifiant.

### **I.5.2 Principe de l'enrobage**

Les techniques d'enrobage permettant la formation du film résultent de l'union par coalescence des polymères après évaporation du solvant. Cette étape dépend de la viscosité et de la tension superficielle de la solution.

Au cours de la formation du film, trois structures peuvent apparaître :

- L'organosol qui est une solution de l'agent filmogène dans un solvant appliqué sur un substrat.
- L'organogel qui correspond à l'organisation d'un gel plus ou moins rigide.
- La phase solide ou vernis.

Ces trois stades coexistent sur la même surface ; c'est un passage progressif d'une phase à l'autre.

La genèse d'un film est liée non seulement aux propriétés intrinsèques des polymères (comme l'aptitude à la liaison intermoléculaire) mais aussi aux facteurs extérieurs (solvant, concentration, température, vitesse d'évaporation etc.).

### **I.5.3 Structure moléculaire et propriétés filmogènes**

La qualité des films dépend des forces intermoléculaires qui peuvent être développées par les groupes fonctionnels susceptibles d'établir des liaisons inter ou intramoléculaires. Parmi les plus importants, on note:

- Les liaisons hydrogène: elles s'établissent entre un atome d'hydrogène et un hétéroatome.
- Les forces de Van Der Waals : elles peuvent créer des liens intermoléculaires, mais elles sont faibles par rapport aux liaisons de valence du polymère.

La formation du film dépend de certains critères tels que la température minimale de formation du film, les variations du pH, la température de travail, du séchage, les caractéristiques intrinsèques du polymère, la présence de tensioactifs, la concentration en pigments et les plastifiants.

### **I.5.4 Caractérisations physiques des films d'enrobage**

Un film d'enrobage peut être caractérisé suivant trois critères:

- La cohésion
- L'adhérence
- La perméabilité



#### **I.5.4.1 La cohésion**

Elle se produit pendant la solidification du polymère par l'évaporation du solvant. Elle est influencée par plusieurs facteurs :

- La solvation : un faible degré de solvation est important.
- La viscosité : une faible viscosité est souhaitable.
- La pression et le temps de contact. La cohésion dépend de la durée pendant laquelle une couche nouvellement déposée reste sous forme solution.
- L'élévation de la température forme un film de bonne cohésion.
- L'épaisseur du film : on définit la force de cohésion des pellicules par le travail fourni pour désunir les couches liées au film. Cette force dépend de l'épaisseur et de la nature chimique du polymère.

#### **I.5.4.2 L'adhérence**

C'est le pouvoir que possèdent deux surfaces voisines, de matériaux différents, de former, par action mécanique, des liaisons qui s'opposent à leur séparation. L'adhérence du film d'enrobage à la surface des supports est plus ou moins régulière et dépend de la bonne pénétration du liquide d'enrobage dans les pores des supports. De plus, la pénétration du liquide d'enrobage dépend de la tension superficielle de la solution, de la tension de surface du support solide et de la tension inter faciale entre le liquide et le solide.

#### **I.5.4.3 La perméabilité**

Les films d'enrobage peuvent être assimilés à des membranes semi-perméables, formées de nombreux pores qui s'étendent dans toutes les directions. La polarité des molécules du filmogène a une influence importante sur la structure du film et par conséquent sur la perméabilité. Ainsi plus un film est polaire, plus ses molécules sont ordonnées donc moins il est poreux, et perméable aux gaz.

#### **I.5.5 Technique d'enrobage des aliments**

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour former des enrobages et films comestibles. Certaines d'entre elles peuvent être réalisées en laboratoire, en cuisine ou dans les magasins d'alimentation. D'autre par contre sont très sophistiquées et ne peuvent être réalisées seulement que dans les industries alimentaires.

#### **I.5.5.1 Immersion**

L'immersion est utilisée pour l'enrobage des produits de petite taille de forme régulière ou pas. Elle consiste à immerger les produits dans un récipient contenant la solution de polymère. Le temps d'immersion n'est pas important mais il faut s'assurer du bon mouillage de toute la surface du fruit. Les produits enrobés seront ensuite séchés à l'air ambiant.

#### **I.5.5.2 Pulvérisation**

Les films formés par aspersion sont plus uniformes et fins que ceux produits par immersion. Elle peut être utilisée pour former un deuxième enrobage comme par exemple l'ajout d'une solution cationique pour le pontage des enrobages d'alginate ou de pectine (Fennema et *al*, 1994)

#### **I.5.5.3 Enrobage par film tombant**

Cette technique consiste à couler puis brosser le polymère à la surface du produit. Elle peut être utilisée pour l'enrobage de tous les genres d'aliments. Dans ce cas, le contrôle de la viscosité est la clé de réussite pour obtenir des enrobages à une épaisseur désirée (Chen 1995).

Le choix de la formulation d'un film ou d'un enrobage dépend certes du produit sur lequel il doit être appliqué, en particulier de son adéquation avec ses caractéristiques sensorielles, mais aussi et surtout de son efficacité à ralentir les transferts de matière (eau, gaz, arôme, etc.) entre l'aliment et son environnement et entre les différents compartiments au sein même d'un aliment hétérogène. Il est donc nécessaire de pouvoir quantifier avec précision ces transferts sous la forme d'une valeur de perméabilité. Cette dernière est fondamentale pour estimer la durée de conservation optimale des produits emballés ou enrobés.

#### **I.5.6 Transferts de matière au travers des films et enrobages comestibles**

Les transferts de matière dans les emballages alimentaires se produisent soit par flux capillaire dans des discontinuités comme les pores, les micro-trous, les fissures au niveau de l'emballage lui-même et dans les zones de jonction et de fermeture, ou encore par les phénomènes de perméabilité ou de diffusion au travers de la membrane.

Le transfert de matière au travers des emballages comestibles est décrit par trois coefficients : le coefficient de diffusion (D), le coefficient de solubilité (S) et le coefficient de perméabilité (P).

#### **I.5.6.1 Le coefficient de diffusion**

La diffusion du pénétrant peut être décrite comme une succession de « pas » ou de « sauts » durant lesquels la molécule passe d'une position à une autre en franchissant des barrières énergétiques. Le coefficient de diffusion est un paramètre cinétique qui correspond à la vitesse de transfert. Il reflète la facilité avec laquelle une molécule du pénétrant se déplace dans le milieu continu et isotrope et dépend à la fois des caractéristiques physico-chimiques du milieu (degré de plastification, viscosité, densité, cristallinité, etc.) et du pénétrant (taille, forme, état physique, etc.).

#### **I.5.6.2 La sorption et le coefficient de solubilité**

Le processus de sorption est décrit comme la distribution du pénétrant entre deux ou plusieurs phases. Il comprend les phénomènes d'adsorption, d'absorption, d'incorporation dans des espaces vides, mais aussi de formation d'agrégats nommés « clusters », de « coquilles de solvation. La sorption représente également la propriété thermodynamique d'équilibre du système polymère pénétrant. Le coefficient de solubilité dépend de la température et peut varier avec la pression partielle.

#### **I.5.6.3 Le coefficient de perméabilité**

Le coefficient de perméabilité ou perméabilité (P) est défini comme étant le produit des coefficients de diffusion et de solubilité. Il comprend à la fois les propriétés cinétiques et thermodynamiques du système polymère-pénétrant.

## **CHAPITRE II**

**INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE CHITOSANE ET DU  
GLYCEROL SUR LES PROPRIETES D'UN FILM COMESTIBLE  
PRESENTE PAR LA METHODOLOGIE DE SURFACE DE RESPONSE**



**Le chapitre II** décrit, sous forme d'un article publié dans *Journal of Polymer and Environment* l'effet des concentrations de chitosane et de glycérol sur les propriétés de perméabilités (aux gaz et à la vapeur d'eau), et les propriétés mécaniques des films comestibles. Des études ont été effectuées sur des films comestibles pour déterminer les concentrations optimales de chitosane et de glycérol sur lesquelles sera incorporé le système enzymatique.

### **Résumé**

Les effets individuels et d'interaction des concentrations de chitosane et de glycérol sur les propriétés des films comestibles ont été étudiés par la méthodologie de surface de réponse. Les résultats de l'analyse de variance ont indiqué que toutes les variables indépendantes (chitosane et glycérol) présentaient un effet significatif sur les propriétés des films. La concentration de chitosane avait un effet positif sur la perméabilité de CO<sub>2</sub>, et un effet négatif sur la perméabilité de O<sub>2</sub> tandis que la concentration de glycérol avait un effet positif sur la perméabilité des deux gaz. Concernant la perméabilité de la vapeur d'eau, la concentration de chitosane avait un effet négatif, tandis que le glycérol n'avait pas d'influence. En outre, les concentrations de chitosane et du glycérol ont influencé le pourcentage de l'allongement à la rupture (% A) du film, et seul la concentration de glycérol avait un effet significatif sur la résistance à la rupture du film. Une optimisation par une approche de désirabilité a été réalisée sur les deux variables indépendantes afin d'obtenir les valeurs optimales dans les conditions expérimentales. Cette procédure a indiqué que les films obtenus à partir de 1,5% de chitosane et 25% de glycérol (p/p de chitosane) pouvaient retarder la respiration et augmenter la perméabilité à la vapeur d'eau.

# INFLUENCE OF THE CONCENTRATIONS OF CHITOSAN AND GLYCEROL ON EDIBLE FILM PROPERTIES SHOWED BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

---

Mohamed Cissé • Didier Montet • Gérard Loiseau • Marie-Noëlle Ducamp-Collin

*Journal of Polymer and Environment*

**Accepted:** DOI 10.1007/s10924-012-0437-2

**Published online:** 24 April 2012

---

**Abstract:** The individual and interactive effects of glycerol and chitosan concentrations on edible film properties were investigated using response surface methodology. The results of ANOVA indicated that all the independent variables exhibited significant effect on the film properties. Chitosan concentration had a positive effect on CO<sub>2</sub> permeability and negative effect on O<sub>2</sub> while the glycerol concentration had a positive effect on permeability to both gases. Regarding water vapor permeability, the chitosan concentration had a negative effect, whereas the glycerol had no influence. Moreover, both chitosan and glycerol concentration influenced the elongation at break point (%A), and only glycerol concentration had a significant effect on tensile strength. Optimization by desirability approach was carried out on the independent variables to get the optimum levels within the experimental conditions. It was found that 1.5 % of chitosan and 25 % of glycerol (wt/wt of chitosan) retarded respiration and showed a strong permeability to water vapor.

**Keywords:** Gas permeability, Water vapor permeability, Mechanical properties and chitosan edible film.

## II.1 Introduction

Many storage techniques have been developed to extend the useful marketing time and holding periods for fresh horticultural commodities after harvest. Various authorities have estimated that, unfortunately, 25-80 % of harvested fresh produce are lost due to spoilage every year, with highest losses in tropical regions (Baldwin 1994). Fruits and vegetables are highly perishable commodities that require to be handled with much care to minimize losses. They are biologically active and carry out transpiration, respiration, ripening and other biochemical activities, which deteriorate the quality of the produce. Respiration plays a very significant role in the postharvest life of the fruits. In climacteric fruits, respiration intensity increases rapidly with ripening particularly when senescence and deterioration of the fruits begin. To extend the postharvest life of the fruits and delay ripening, its respiration rate should be reduced. One method of extending postharvest shelf-life is the use of edible coatings. Such coatings are made of edible film materials that are used to enrobe fresh produce, providing a semi-permeable barrier to gases and water vapor. This method has been described in several reviews (Park *et al*, 2001; Tharanathan 2003). Edible films and coatings have been investigated for their abilities to retard moisture, oxygen, aromas and solute transfers (Gennadios and Weller 1990).

They offer some advantages such as edibility, biocompatibility, aesthetic appearance, barrier properties, non-toxic, non-polluting and having low cost (Han 2000). One major advantage of using edible films and coatings is that several active ingredients can be incorporated into the polymer matrix and consumed with the food, thus enhancing safety or even nutritional and sensory attributes (Greener and Fennema 1994; Franssen and Krochta 2003). Film production from natural and abundant biodegradable polymeric materials such as cellulose, gums, starches or proteins, is also convenient due to the lower environmental consequences compared with common synthetic plastic materials (Cutter 2006).

Chitosan is a de-N-acetylated form of chitin that is the second most abundant natural polymer in the world obtained from the shells of crab, shrimp, etc. It consists mainly of a polymer of beta (1-4)-2 amino-2-deoxy-D-glucose units. This natural biodegradable polymer is non-toxic, antibacterial, and has been employed in a variety of applications (Tharanathan 2003). It can form transparent films, which may find application in a variety of packaging needs. Chitosan films were used to extend the

shelf life of mango at room temperature (Srinivasa et al, 2004) and their sensory quality was found to be better than the mango stored in synthetic plastic films (Srinivasa et al, 2004). These films use as edible film or coating were also useful in extending the shelf life of fruit and vegetables (No et al, 2007; Martínez-Camacho et al, 2010). The disadvantage of these films is that they are brittle and hydrophilic.

The addition of plasticizing agents is essential to overcome the brittleness of biopolymeric films. Brittleness is an inherent quality attributed to the complex/branched primary structure and intermolecular forces of natural polymers. Plasticizers act by reducing the intermolecular forces softening the rigidity of the film structure, increasing the mobility of the biopolymeric chains, thus improving the mechanical properties by decreasing brittleness. Glycerol is the best plasticizer (Suyatma et al, 2005). It can improve film flexibility; reduce film puncture strength, elasticity and water vapor barrier properties (Gontard et al, 1993). The choice of solvent used during film making may affect the permeability of gas, water vapor and mechanical properties of the chitosan film. Park et al. (2002) studied the effect of four types of organic solvents (acetic, malic, lactic, and citric acid) on the chitosan films. They showed that behavior of the films differed towards the solvent. Use of acetic acid resulted in films with the greatest tensile strength while citric acid formed weaker films than the other acids. The oxygen barrier of chitosan films prepared with malic acid was the greatest among the acid solutions tested.

The objective of this study was to determine the influence of chitosan and glycerol concentrations on the properties of edible films, using an experimental design and a response surface methodology analysis. The goal was to make films with a good elongation at break (A) and a good tensile strength (TS), permeable to carbon dioxide and less permeable to oxygen and water vapor (WVP).

Response surface methodology (RSM) has been reported to be an effective tool for optimizing a process when the independent variables have a combined effect on the desired response (Hunter 1959). Several researches used this method for designing food formulations, including the effect of storage conditions on chitosan film (Srinivasa et al, 2007), the optimization of the components concentrations of the lactoperoxidase system for enhancing its antimicrobial efficiency (Adolphe et al, 2006), the effect of relative humidity and temperature on gluten film (Mujica-Paz and Gontard 1997). In the present study, the effect of chitosan-glycerol concentrations on



the gas (CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>) and water vapor permeability, the mechanical properties such as tensile strength (TS) and elongation at break (A) of edible films has been studied by RSM.

## II.2 Materials and Methods

### II.2.1 preparation of Film Forming Solutions

Chitosan ([90 % DDA) was obtained from France Chitin (Marseille, France). Chitosan solution was prepared by dissolving chitosan flakes in distilled water (80 mL) containing 0.7 mL of lactic acid (Sigma, Japan) under agitation using a magnetic stirrer during 4 h at room temperature. The pH of the solution was adjusted to pH 5.5 with 0.46 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Switzerland) and the solution was made up to 100 mL with distilled water.

Glycerol (% wt/wt of chitosan) was added and the solution was stirred for 30 min. The chitosan and glycerol final contents in solutions varied according to Tableau 1.

**Tableau 1:** Doelhert experimental design for the independent variables (levels and data values

Exp N°	Values coded		Values reals	
	Chitosan (%)	Glycerol (%)	Chitosan (%)	Glycerol (%)
1	-0.866	-0.500	1.07	12.50
2	-0.866	0.500	1.07	37.50
3	0.000	-1.000	1.50	0.00
4	0.000	1.000	1.50	50.00
5	0.000	0.000	1.50	25.00
6	0.000	0.000	1.50	25.00
7	0.000	0.000	1.50	25.00
8	0.866	-0.500	1.93	12.50
9	0.866	0.500	1.93	37.50

### II.2.2 Film Preparation

Chitosan-glycerol solutions (10 g) were poured into Petri dishes ( $d = 14$  cm) and dried under controlled environmental conditions ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2$  and  $90\% \pm 5$  RH) using climatic chamber during 3 days. After drying, the films were peeled off and analyzed. The thickness of the films was measured with a micrometer (Mitutoyo, Japan). Five readings were taken at random positions around the film, and the average represented the film thickness.

### II.2.3 Permeability Measurement

Oxygen permeability ( $\text{PO}_2$ ) and carbon dioxide permeability ( $\text{PCO}_2$ ) were measured at  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $90 \pm 5\%$  RH in a controlled-temperature room using a standard isostatic method described by Gontard *et al.*, (1996).

Samples were exposed to 100 % oxygen on one surface and to 100 % dioxide carbon on the other, at atmospheric pressure. Our specially designed permeability cell contained two circular (8 cm diameter 9 0.5 cm deep) 25 mL chambers separated by the film sample, of which 50 cm<sup>2</sup> was exposed to both chambers and sealed with an O-ring.

At steady state (constant oxygen and carbon dioxide concentration), the permeat gas that passed through the film was deducted with a syringe and measured using a gas analyzer GC 800 (CE instrument, Italy) for oxygen and GC 1000 (Dani, Italy) for carbon dioxide. Flow rates were measured with an intelligent flowmeter ADM 1000 (J & W, USA), and pressures in the chambers were equalized and maintained at atmospheric pressure.

Oxygen or carbon dioxide permeability ( $P$ ) was calculated as follows:

$$P = J(\Delta X) / A (\Delta p)$$

with  $P$  in amol/msPa (amol is  $10^{-18}$  mol).  $J$  is the flow of oxygen or carbon dioxide though the film (in amol/s),  $D_x$  is the film thickness (m),  $D_p$  is the differential partial pressure across the film (Pa), and  $A$  is the surface area of the film (m<sup>2</sup>). Three replicates of each film were tested.

### II.2.4 Water Vapor Permeability (WVP)

WVP was determined according to the ASTM gravimetric method E 96-00 (ASTM 2000). Aluminum cups (7 cm diameter and 2 cm deep) containing 10 g of anhydrous

CaCl<sub>2</sub> (0 % RH) were covered by film samples of 38.48 cm<sup>2</sup> area and isolated with wax at the edges. The cups were placed in a climatic chamber with controlled temperature and humidity respectively at  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}/90 \pm 5\%$  RH. Weight loss graphs were plotted with respect to time, and the linear least-square method was used to calculate water vapor transmission rate (WVTR) using the equation:

**WVTR = slope / film area.**

WVP was calculated from **WVP = WVTR.L /  $\Delta P$** . Where water vapor transmission rate (WVTR) is the slope/ film area (g/m<sup>2</sup> d), L is the film thickness (mm), and DP is the partial water vapor pressure difference (kPa) between the two sides of the film.

### **II.2.5 Mechanical Properties**

Tensile strength (TS) and % elongation at break (A) were determined according to ASTM method D 882 (ASTM 2001) with a texturometer TAXTplus (5 kg) (Instron Co., USA). Initial grip separation and cross-head speed were set at 10 mm and 0.3 mm/s respectively. Strips of film samples (7 cm × 1 cm) were analyzed. TS was calculated by dividing the maximum load by the initial cross-sectional area of the sample and expressed in MPa. The ratio A (%) was calculated as the elongation at the rupture point of sample to the initial length of a sample as a percentage.

### **II.3 Experimental Design and Data Analysis**

The experimental design of Doehlert (Doehlert 1970) was chosen for this study. That mathematical tool was chosen to replace the traditional kinetic in order to study the interaction between factors and to obtain the maximum of information and precision from a reduced number of experiments.

Determination of variable values and the total experiment number was done according to the software Statistica 7. The design variables selected in this study with actual and coded levels along with response variables are given in Tableau 2. The total experiment number (N) for 2 factors (k) was 9, including three duplicates of the center of the design.

Experiments were carried out according to the design points with independent variables such as chitosan ( $x_1$ ), and glycerol concentrations ( $x_2$ ). A quadratic model was applied to analyze the effect of independent variables on response parameters (PCO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>, WVP, A and TS) by matching the responses studied (Y) with the code factors ( $x_i$ ,  $i = 1, \dots$ ) using the polynomial model associated with experimental design

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n b_{ij} x_i x_j$$

b<sub>0</sub> was the constant coefficient, b<sub>i</sub> were the first order linear coefficients, b<sub>ii</sub> were the quadratic coefficients and b<sub>ij</sub> the second order interaction coefficients. Data analysis, ANOVA and multilinear regression including responses optimization and desirability were performed by using Statistica 7 software.

Response surface graphs were obtained from the regression equation in coded levels of variables, keeping the response function on the Z axis with X and Y axes representing the independent variables.

**Tableau 2: Experimentally determined dependent film properties**

Independent variables (Values coded)				Dependent variables		
Chitosan (%)	Glycerol (%)	PCO <sub>2</sub> (amol.m/m <sup>2</sup> s.Pa)	PO <sub>2</sub> (amol.m/m <sup>2</sup> s.Pa)	WVP (10 <sup>-6</sup> gm/ m <sup>2</sup> JPa)	TS (MPa)	A (%)
-0.866	-0.500	5617.87	13684.61	1.23	2.56	28.76
-0.866	0.500	8332.47	27200.2	1.19	1.52	26.11
0.000	-1.000	434.45	849.706	0.73	8.31	1.45
0.000	1.000	134102.6	109340.5	0.72	1.42	25.72
0.000	0.000	158105.2	15604.39	0.37	2.22	8.41
0.000	0.000	162756.3	16063.34	0.37	1.31	12.26
0.000	0.000	897.25	1215.39	0.76	2.40	13.40
0.866	-0.500	988.69	1087.75	0.71	2.57	15.27
0.866	0.500	984.88	1309.68	0.68	2.37	14.04



## **II.4 Results and Discussion**

The regression coefficients, statistical analysis, and level of significance of the selected models are presented in Tableau 3. Only the values that are statistically significant ( $p < 5\%$ ) are discussed.

Tableau 3 shows the Analysis of variance of chitosan and glycerol concentration on gases permeability. Permeability of the films was determined in a thermostatic chamber. Temperature was set at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  and relative humidity measured was  $90 \pm 3\%$ . These different conditions were set as approximate conditions usually used for mango.

**Tableau 2: Analyse of variance of chitosan and glycerol on gases and water vapor permeability**

	<b>Regression Coef.</b>	<b>Err-Type</b>	<b>t(2)</b>	<b>-95 %</b>	<b>+95 %</b>
<b>CO<sub>2</sub> permeability (R<sup>2</sup>=0.94)</b>					
<b>Moy/Ord.Orig</b>	956.94	29.86	32.04***	828.45	1085.44
<b>Chitosan</b>	86600.50	29.19	2966.59***	86474.89	86726.10
<b>Chitosan<sup>2</sup></b>	84291.35	45.11	1868.3***	84097.24	84485.47
<b>Glycerol</b>	45783.50	29.86	1533***	45655.00	45912.00
<b>Glycerol<sup>2</sup></b>	66311.57	47.22	1404.28***	66108.39	66514.74
<b>Chit*Gly</b>	1092.32	58.38	18.71**	841.11	1343.52
<b>O<sub>2</sub> permeability (R<sup>2</sup>=0.84)</b>					
<b>Moy/Ord.Orig</b>	1204.28	64.31	18.73**	927.59	1480.97
<b>Chitosan</b>	-2600.76	62.86	-41.37***	-2871.21	-2330.30
<b>Chitosan<sup>2</sup></b>	4409.13	97.14	45.39***	3991.14	4827.11
<b>Glycerol</b>	38492.70	64.31	598.58***	38216.01	38769.39
<b>Glycerol<sup>2</sup></b>	53890.84	101.68	530.01***	53453.35	54328.32
<b>Chit*Gly</b>	-7368.31	125.71	-58.61***	-7909.21	-6827.40
<b>WVP permeability (R<sup>2</sup>=0.9)9</b>					
<b>Moy/Ord.Orig</b>	0.72	0.02	31.06**	0.62	0.82
<b>Chitosan</b>	-0.47	0.02	-20.85**	-0.57	-0.38
<b>Chitosan<sup>2</sup></b>	0.09	0.03	2.53	-0.06	0.24
<b>Glycerol</b>	-0.01	0.02	-0.45	-0.11	0.09
<b>Glycerol<sup>2</sup></b>	0.01	0.04	0.24	-0.15	0.17
<b>Chit*Gly</b>	0.02	0.04	0.5	-0.17	0.22
<b>TS (R<sup>2</sup>=0.89)</b>					
<b>Moy/Ord.Orig</b>	2.45	0.06	38.79***	2.18	2.72
<b>Chitosan</b>	-0.15	0.06	-2.51	-0.42	0.11
<b>Chitosan<sup>2</sup></b>	-1.46	0.09	-15.34***	-1.88	-1.05
<b>Glycerol</b>	-2.62	0.06	-41.42***	-2.89	-2.34
<b>Glycerol<sup>2</sup></b>	2.41	0.10	24.15***	1.98	2.84
<b>Chit*Gly</b>	0.08	0.12	0.66	-0.45	0.61
<b>A (R<sup>2</sup>=0.86)</b>					
<b>Moy/Ord.Orig</b>	14.24	0.54	25.98***	11.88	16.60
<b>Chitosan</b>	-9.65	0.53	-18.00***	-11.96	-7.34
<b>Chitosan<sup>2</sup></b>	6.12	0.82	7.39	2.56	9.69
<b>Glycerol</b>	8.29	0.54	15.12***	5.93	10.65
<b>Glycerol<sup>2</sup></b>	-0.66	0.86	-0.76	-4.39	3.07
<b>Chit*Gly</b>	3.67	1.07	3.42	-0.94	8.28

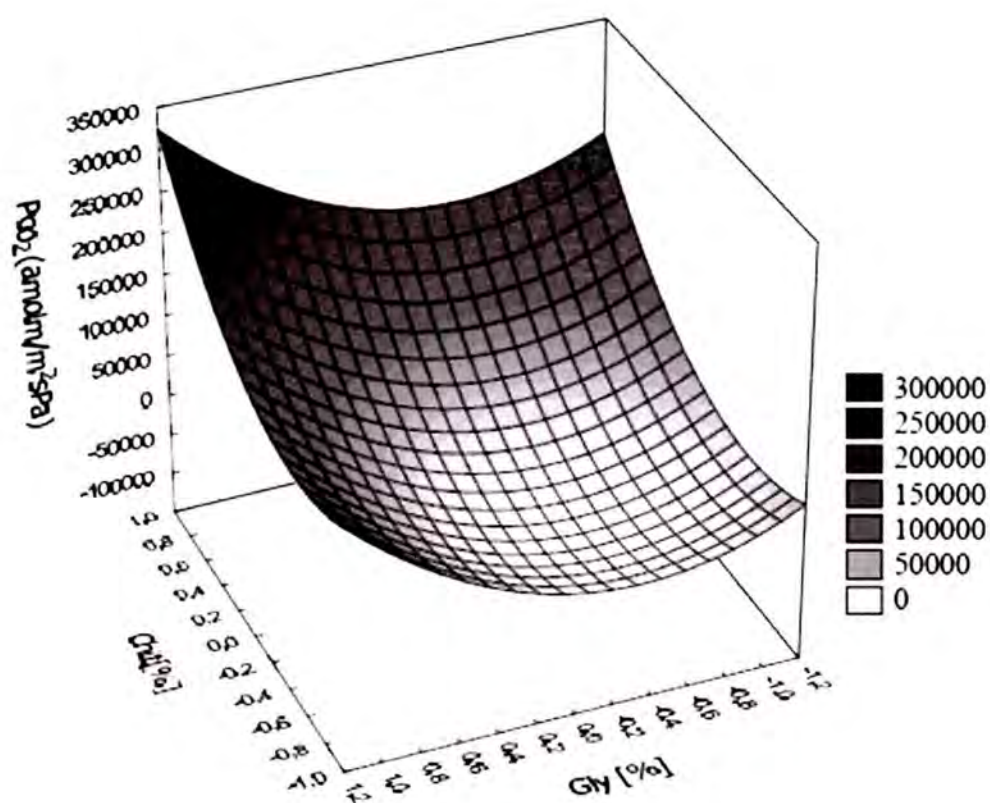
\*\* p<00.5; \*\*\*p< 0.01

#### II.4.1 Permeability Measurement

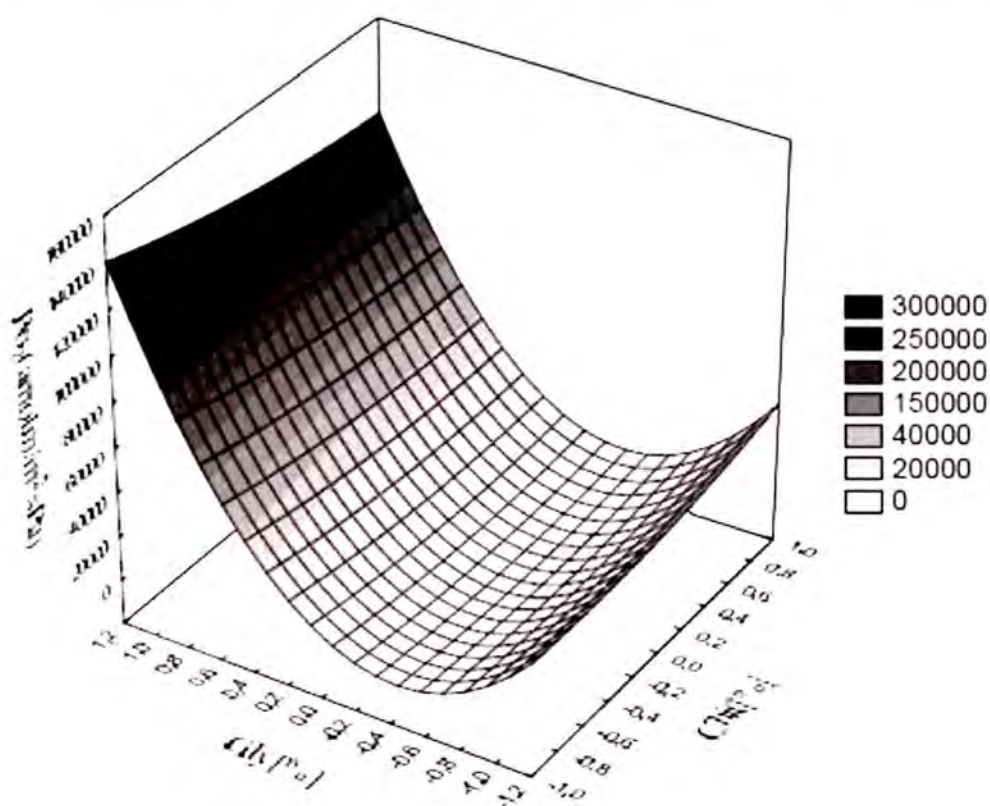
Permeability values are presented in Tableau 2. They ranged from 434.45 to 162756.3 and from 849.71 to 27200.2  $\text{amol/m s Pa}$ , respectively for  $\text{PCO}_2$  and  $\text{PO}_2$ . Gontard et al. (Gontard et al, 1996) results indicated 8,010 and 472  $\text{amol/ m s Pa}$  respectively for  $\text{PCO}_2$  and  $\text{PO}_2$  of chitosan at  $25^\circ\text{C}$  and 93 %RH, while Pavlath et al. (1999) found very low values  $\text{PCO}_2$  and  $\text{PO}_2$  (1.83 and 0.57  $\text{amol/m s Pa}$  respectively) of chitosan at  $25^\circ\text{C}$  and 0 % RH. The high values of gases permeability found were due to high RH of environment around the film. According to Elson et al. (Elson et al, 1985), permeability of a film based on chitosan was very sensitive to humidity. At relative humidity below 70 %, films are relatively impermeable to gases ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ). For more than 90 % RH, permeability of these two gases increases sharply. The same phenomenon was observed by Gontard et al. (1996) who reported that the permeability to  $\text{O}_2$  increased from 0.441  $\text{mL mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{atm}^{-1}$  at 0 % RH to 3652.86  $\text{mL mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{atm}^{-1}$  when RH raised to 93 % and for  $\text{CO}_2$  from 15.132  $\text{mL mm.m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{atm}^{-1}$  at 0 % R.H to 66233.42  $\text{mL mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{atm}^{-1}$  at 93 % RH.

Linear positive coefficients of chitosan and glycerol concentrations indicated that the increase of these factors lead to a high permeability of  $\text{CO}_2$ . There was a positive interaction between chitosan and glycerol on the  $\text{CO}_2$  permeability. For the  $\text{O}_2$  permeability, linear coefficient was negative for chitosan concentration and positive for glycerol concentration. The interaction chitosan–glycerol was negative.

From Fig. 1, it is possible to observe that above 25 % glycerol,  $\text{CO}_2$  permeability increased exponentially and reached very high values at 50 % glycerol. The same increase was observed when the chitosan concentration reached an extreme value of 2 %. We observed too an increase of  $\text{O}_2$  permeability in the presence of glycerol. But the oxygen diffused hardly through the film (Tableau 3; Fig. 2) so chitosan film was more selective to  $\text{CO}_2$  than to  $\text{O}_2$ . This result was confirmed by several authors (Wong et al, 1992; Butler et al, 1996; Gontard et al, 1996). However, Bai et al. (1988) reported a greater permeability for oxygen than  $\text{CO}_2$ . The incorporation of plasticizer (glycerol) in the formulation of chitosan film increased the permeability to  $\text{CO}_2$  and  $\text{O}_2$  (Wong et al, 1992; Butler et al, 1996; Gontard et al, 1996).



**Figure 1:** Effect of the interaction chitosan-glycerol on the CO<sub>2</sub> permeability



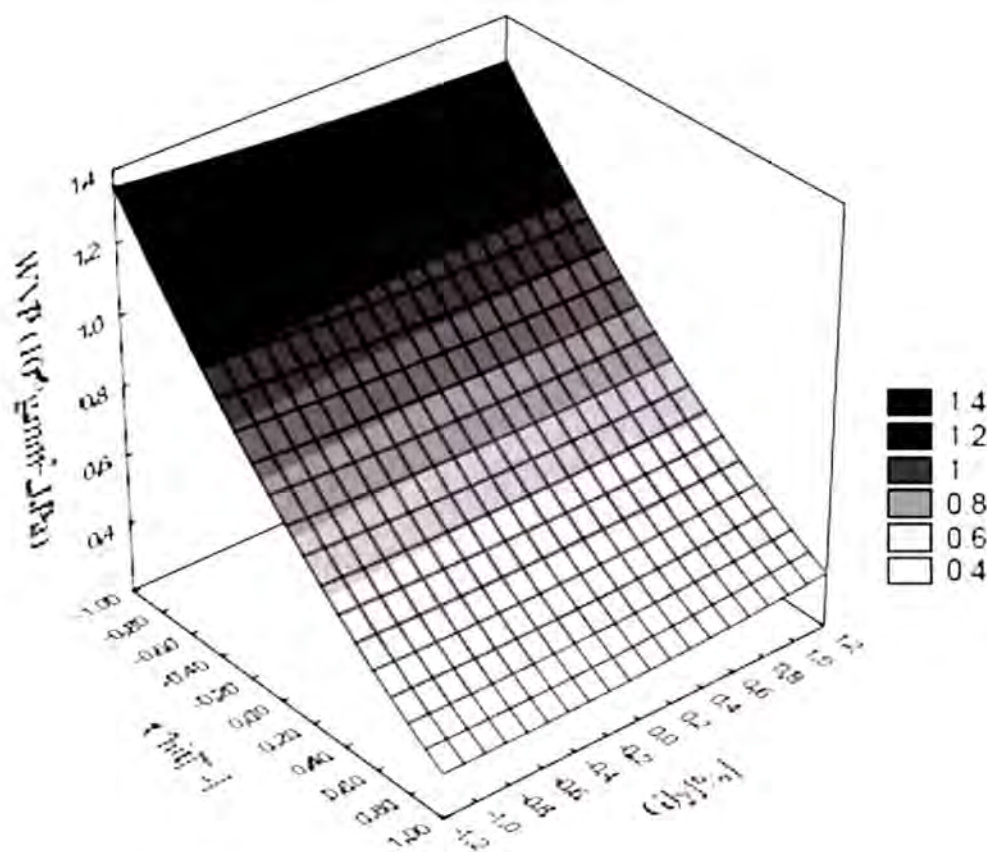
**Figure 2:** Effect of the interaction chitosan-glycerol on the O<sub>2</sub> permeability



#### II.4.2 Water Vapor Permeability (WVP)

The best data that described the relationship between water vapor permeability and the independent factors (chitosan and glycerol concentrations) is shown in Tableau 3 and represented in Fig. 3. Only chitosan had a significant effect on the WVP, and this effect is linear and negative. It can be seen that chitosan concentration had a negative effect on water vapor permeability values of the films. This tendency is in accordance with previous results of Chillo *et al.*, (2008) who report that chitosan addition had a negative effect on water vapor permeability values of a tapioca starch-based edible film. However, the results of Amiali in his thesis (1999) showed that the concentration of the chitosan solutions had no significant effect ( $p < 5\%$ ) on film permeability to water vapor, which was more influenced by the molecular weight of chitosan.

Addition of glycerol did not affect significantly ( $p < 0.05$ ) the behavior of the film vis-à-vis the permeability to water vapor (Tableau 3). This observation is different from those of other authors who differ on the effect of glycerol on WVP. Some argue that glycerol increases the WVP (Chillo *et al.*, 2008; Ziani *et al.*, 2008) because glycerol could be inserted between adjacent polymeric chains, decreasing intermolecular attractions, thus, facilitating the migration of water vapor molecules. On the other hand, others reported that it decreases WVP (Butler *et al.*, 1996; Srinivasa *et al.*, 2004). This decrease could be due to the formation of hydrogen bonds in between chitosan chains, thereby influencing water diffusion. This difference of glycerol action on WVP of chitosan film may be due to the intrinsic chemical nature of chitosan and also to the way the blend films are prepared.



**Figure 3:** Effect of the interaction chitosan-glycerol on the WVP

### II.4.3 Mechanical Properties

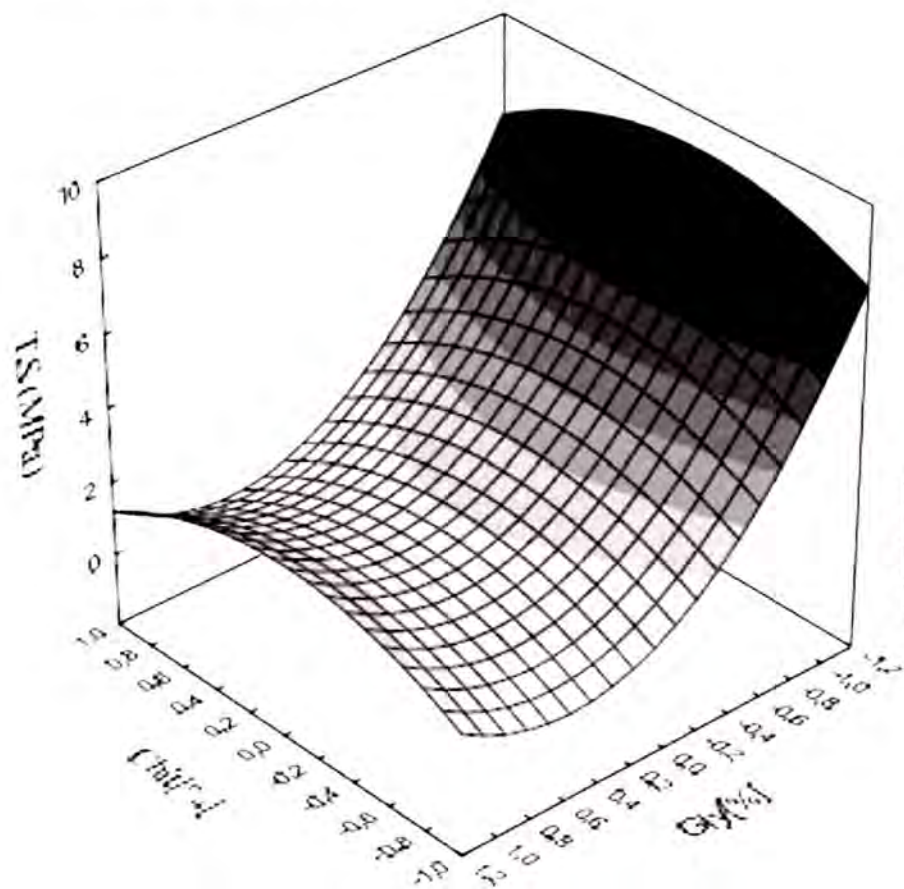
The mechanical properties of chitosan–glycerol films are shown in Tableau 3. TS indicates the maximum tensile stress that the film could support, and A (%) is the maximum change in length of a test specimen before breaking.

Results indicated that these properties varied depending on the amount of glycerol and chitosan. TS values were negatively affected by the quadratic and linear terms of chitosan and the glycerol contents respectively, while positively influenced by glycerol quadratic factor. Also the A (%) values were influenced by the linear negative factor of chitosan and positive factor of glycerol. The mechanic properties values of chitosan–glycerol interaction are not significant. In the ANOVA (Tableau 3), the average TS (2.45) was nearly equal to the value of the linear effect of glycerol (2.62). So the main effect on TS corresponded to glycerol effect. In order to better understand the individual effects of chitosan and glycerol variables on the mechanical parameters, the surface response plots were analyzed. Figure 4 showed the three-dimensional surface response plot of TS versus the two independent variables studied in this work. From this figure it is possible to observe that the tensile strength value

increased with decrease of glycerol concentration. This result is in accordance with the literature (Srinivasa et al, 2007; Ziani et al, 2008).

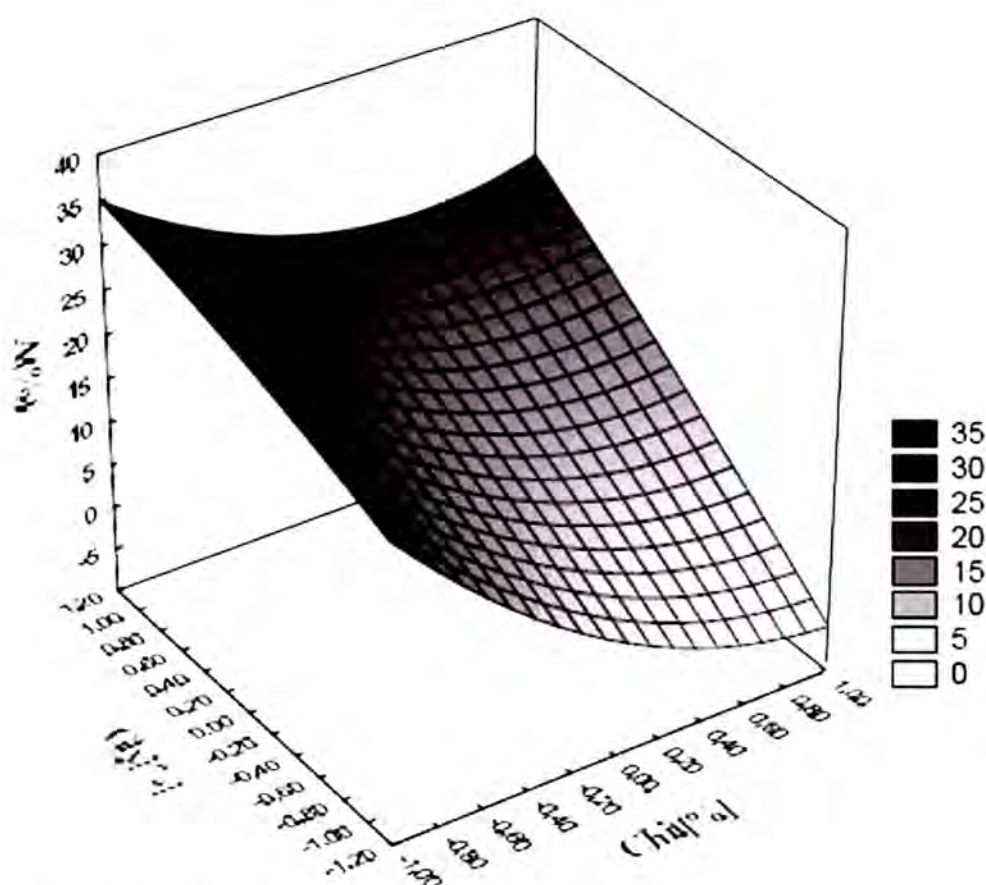
The equation of the elongation at break (A) showed that A (%) increased with decrease of chitosan concentration and increase of glycerol concentration (Fig. 5). Suyatma et al, (2005) observed an increase of A (%) when glycerol content increased. Chillo et al, (2008) observed a dependence of the elongation at break to glycerol concentration.

According to literature, glycerol interferes with chitosan chains, decreasing intermolecular attraction and increasing polymer mobility, which facilitates film elongation and decreases its tensile strength.



**Figure 4:** Effect of the interaction chitosan-glycerol on the TS





**Figure 5:** Effect of the interaction chitosan-glycerol on the A

#### II.4.4 Optimal Composition of Chitosan–Glycerol Film

The results of the statistical analysis that lead to the optimal composition of chitosan–glycerol films were reported in Tableau 4. To obtain a film permeable to CO<sub>2</sub> with high values of A and TS and less permeable to O<sub>2</sub> and WVP, we needed 1.5 % chitosan and 25 % glycerol. Epure et al. (2011) reported that optimal glycerol content for chitosan plasticization was 25 % wt to obtain a visually good chitosan film.

**Tableau 3: Optimized parameters and desirability values**

Desirable variables		PCO <sub>2</sub> (amolm/m <sup>2</sup> .Pa)	PO <sub>2</sub> (amolm/ m <sup>2</sup> .Pa)	WVP (10 <sup>-6</sup> gm/m <sup>2</sup> .J.Pa)
Goal		Maximum	Minimum	Minimum
Chitosan	1.5	956.95	1204.30	0.72
Glycerol	25			



The properties of chitosan–glycerol edible films were influenced by chitosan and glycerol concentrations. In particular, chitosan content had a positive effect on CO<sub>2</sub> permeability and negative effect on O<sub>2</sub> while PCO<sub>2</sub> and PO<sub>2</sub> were positively influenced by glycerol content. For WVP, the chitosan concentration had a negative effect, whereas the glycerol concentration had not an influence. The mechanical properties (TS and A) were influenced by glycerol and chitosan concentrations. Formulation made with 1.5 % chitosan and 25 % glycerol (wt/wt of chitosan) seemed to be adequate to formulate chitosan-based edible films with the aim to preserve perishable food crops.

**CHAPITRE III**  
**INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE L'HUMIDITE RELATIVE**  
**SUR L'IMMOBILISATION DU SYSTEME**

Le système enzymatique a été incorporé dans le gel de chitosane de 1,5% (p/p) contenant le glycérol de 25% (p/p de chitosane). Le chapitre III présenté sous forme d'un article publié dans Food Hydrocolloids, d'écrit la corrélation entre les facteurs environnementaux (température, humidité relative) et la persistance des molécules antimicrobiennes produites par le système enzymatique dans les films. Ce chapitre met évidence également l'activité antimicrobienne du couplage chitosane-système lactoperoxydase.

### Résumé

L'effet de la température (10-30°C), de l'humidité relative (50-90%) et le temps de stockage (2-10 jours) ont été étudiés sur la production et la persistance des ions thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ) et hypothiocyanite-hypoiodite ( $\text{OSCN}^-$ ,  $\text{OI}^-$ ) produites par le système lactoperoxydase dans les films de chitosane. Les résultats du plan d'expérience et de l'analyse de variance ont indiqué que la température et la période de conservation ont un effet significatif sur les propriétés du film. La température a influencé positivement les ions  $\text{OSCN}^-$ ,  $\text{OI}^-$ , tandis que ces produits ( $\text{OSCN}^-$ ,  $\text{OI}^-$ ) décroissaient durant la période de conservation, et les ions  $\text{SCN}^-$  disparaissaient après deux jours. Le système lactoperoxydase avec l'iode (LPOSI) et sans l'iode (LPOS), incorporés dans le film de chitosane ont montré une activité antibactérienne contre *Xanthomonas campestris* pv. *Mangiferae indicae* sans changer les propriétés de perméabilité aux gaz et à la vapeur d'eau.

## **Influence of temperature and relative humidity on the immobilized lactoperoxidase system in a functional chitosan film**

---

Mohamed Cissé, Didier Montet, Maria Soledad Tapia, Gérard Loiseau, Marie Noëlle Ducamp-Collin

**Food Hydrocolloids 28 (2012) 361-366**

**Accepted: 19 January 2012**

---

### **Abstract**

The effect of temperature (10-30°C), relative humidity (RH, 50-90%), and storage period (2-10 days) were studied on the production and sustainability of thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ) and hypothiocyanite-hypoiodite ( $\text{OSCN}^-$ ,  $\text{OI}^-$ ) components of a lactoperoxidase system (LPOSI) in chitosan film by applying response surface methodology and Doehlert experimental design. The results of analysis of variance indicated that the temperature and storage period exhibited a significant effect on the film properties. Temperature had a positive influence on  $\text{OSCN}^-$ ,  $\text{OI}^-$ , while these products ( $\text{OSCN}^-$ ,  $\text{OI}^-$ ) decreased during the storage period, and  $\text{SCN}^-$  disappeared after 2 days. Lactoperoxidase systems with iodine (LPOSI) or without iodine (LPOS), incorporated into chitosan films, showed inhibition of *Xanthomonas campestris* pv. *Mangiferae indicae* and did not change the chitosan film permeability to gas and water vapor.

**Keywords:** Chitosan film, *Xanthomonas campestris* pv. *Mangiferae indicae*, Response surface methodology, Mechanical and gas permeability properties



### III.1 Introduction

Edible films and coatings have been particularly considered in food preservation, because of their capability in improving global food quality (Mujica-Paz and Gontard 1997; Caner et al, 1998). Efforts have focused on the incorporation of natural antimicrobial agents, including bacteriocins, enzymes, and fruit extracts in the edible films and coatings (Dean and Zottola 1996; Han 2000). Lactoperoxidase system (LPOS) is a natural antimicrobial system found in human secretions such as saliva, tear fluid, and milk (Kussendrager and Hooijdonk 2000). The use of LPOS has been suggested as a preservative in foods and pharmaceuticals (Bosch et al, 2000; van Hooijdonk et al, 2000). Lactoperoxidase (LPO) catalyses the oxidation of thiocyanate ion ( $\text{SCN}^-$ ) and, generates oxidated products such as hypothiocyanite ( $\text{OSCN}^-$ ) and hypothiocyanous acid ( $\text{HOSCN}$ ). These products are known to be antimicrobial agents that inhibit microorganism by the oxidation of sulphydryl (SH) groups of microbial enzymes and other proteins (Reiter and Harnulv 1984; Earnshaw et al, 1990; Kussendrager and Hooijdonk 2000). The antimicrobial effects of the LPOS differ from organism to organism. Rapid inhibition of metabolism and leakage of amino acids and potassium occurs in Gram-positive bacteria. Gram-negative bacteria are more difficult to kill and inhibition is more dependent on temperature (between 5 and 20 °C) and pH ( $5.5 \pm 0.7$ ), but iodide promotes killing independently of these factors (Liu et al, 2006). Fungi are also killed by LPOS<sup>+</sup> with  $\text{I}^-$  as the electron donor (Lehrer 1969). The antimicrobial stability of the LPOS depends on the stability of the oxidation products of  $\text{SCN}^-$  and  $\text{I}^-$ . The oxidation products of  $\text{SCN}^-$  are hypothiocyanite ( $\text{OSCN}^-$ ) and hypothiocyanous acid:

$\text{OSCN}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HOSCN}$ . The oxidation products of  $\text{I}^-$  are hypoiodite ( $\text{OI}^-$ ) and hypoiodous  $\text{OI}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HOI}$ . Decomposition of both acids depends on pH and on the available amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Aune and Thomas 1977; Thomas 1985). Addition of iodide with thiocyanate increased the fungicidal and bactericidal effect against bacteria like *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (Bosch et al, 2000). For this purpose, the presence of the oxidation products ( $\text{OSCN}^-$  and  $\text{OI}^-$ ) must be guaranteed during a long time. Temperature and relative humidity are important factors that affect the system and will be studied. The influence of iodide on the antimicrobial activity of LPOS with thiocyanate was assayed to show if it could improve the film antimicrobial activity. Chitosan is the deacetylated derivative of chitin (b-[1-4]-poly-Nacetyl- D-glucosamine), an abundant by-product of seafood processing. Chitosan has been well known for its good film-forming property, broad antimicrobial activity (Kong et al, 2010), and its excellent compatibility

with other substances due to the presence of the high density of amino groups and hydroxyl groups in chitosan polymer structure (Shahidi et al, 1999). Antimicrobials, antioxidants, nutrients, colorants, and flavors can be possibly carried by chitosan-based films and released in a controlled manner (Park et al, 2004). Like enzyme, chitosan may be combined with other active antimicrobial substances for enhancing its antimicrobial efficacy. Chen et al, (1996) incorporated food preservatives, such as potassium sorbate and sodium benzoate into chitosan film matrix and compared their inhibitory effects on microbial growth. Lee, et al, (2003) reported enhanced microbial stability of milk and orange juice, which were exposed to paperboard coated with chitosan and nisin. Furthermore, synergistic effects of chitosan covalently bonded with lysozyme have been reported by Song, et al, (2002). Chitosan is a renewable and nontoxic polymer with excellent biocompatibility with other substances. Inherent antimicrobial properties of chitosan and its high film-forming and entrapping ability could be the primary driving force in the development of new applications for this underutilized biopolymer.

Chitosan forms films that have relatively good mechanical and barrier properties but chitosan film however could be much friable. The addition of plasticizer agents is necessary to improve the film flexibility. Glycerol is one of the most popular plasticizers used in film-making techniques, due to its stability and compatibility with hydrophilic biopolymeric packaging chains (Cervera et al, 2004).

In this work, our goal was to determine optimal conditions of temperature and relative humidity to fix the LPOSI on chitosan films to maintain as long as possible the oxidated products (OSCN<sup>-</sup>, OI<sup>-</sup>) with the aim to develop an active chitosan film.

Response surface methodology (RSM) has been reported to be an effective tool for optimizing a process when independent variables have effects and interactions on the desired response. Several workers used this method for designing food, as well as edible film formulations. These works included the effect of storage conditions on chitosan film (Srinivasa et al, 2007), the optimization of lactoperoxidase system (Adolphe et al, 2006), the effect of relative humidity and temperature on gluten film formation (Mujica-Paz and Gontard 1997) and the influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties (Chillo et al, 2008). In the present study, the effect of chitosan-glycerol on the gas (CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>) and water vapor permeability, and the concentration of [SCN<sup>-</sup>] and [OSCN<sup>-</sup>, OI<sup>-</sup>] have been studied by RSM. *Xanthomonas campestris* pv. *Mangiferae indicacae*

was used to test the antimicrobial effect of the edible chitosan films incorporated with the lactoperoxidase system.

### **III.2 Materials and methods**

LPOSI was composed of lactoperoxidase (LPO; 140 U/mg), glucose oxidase (GO; 158.9 U/mg); D (+) glucose (Glu), potassiumthiocyanate (KSCN), and potassium iodide (KI). LPO and KSCN were purchased from Bioserae (France), GO and Glu from SigmaAldrich (St. Louis, MO); and KI purchased from Fluka analytical. Chitosan (>90% DDA viscosity [500-2000 cps]) was obtained from France Chitin (Montpellier). Glycerol was purchased from Fisher Scientific Inc. (Fair Lawn, NJ). *X. campestris* pv. *Mangiferae indicae* was obtained from the Collection 'Françaisede Bactérie Phytopathogène' (CFBP, INRA, France).

#### **III.2.1 Preparation of lactoperoxidase system solution**

The weight ratios of the LPOSI components were 1.00; 0.35; 108.70; 1.09; and 2.17, in the order LPO, GO, Glu, KSCN, and iodine. This composition was chosen based on results from previous research and modified slightly by Min and Krochta (2005). The components were dissolved separately in 50 mL of phosphate buffer (pH=6.2). The LPOSI dissolved solution was incubated at  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  for 24 h with shaking at  $160\text{ rev min}^{-1}$  using a water bath shaker (Model G76, New Brunswick Scientific, Edison, NJ), to increase the antimicrobial activity of LPOSI (Bosch et al, 2000; Min et al, 2005).

#### **III.2.2 Preparation of chitosan-LPOSI film**

Chitosan solution was prepared by dissolving 1.5 g chitosan flakes in 80 mL distilled water containing 0.7 mL of lactic acid (Sigma, Japon) under agitation using a magnetic stirrer during 5 h at room temperature. pH of the solution was adjusted to pH 5.5 with 0.46MK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigmae Aldrich, Switzerland) and the solution was made up to 100 mL with distilled water. Glycerol (25% w/w of chitosan) was added and the solution was stirred for 30 min. LPOSI was added to the mixture of chitosan-glycerol solution. The concentration of LPOSI in the chitosan film-forming solution was 5% (v/v). Chitosan-LPOSI solution (10 g) was poured into Petri dishes (d=14 cm) and dried under controlled environmental conditions (Tableau 1) using climatic chamber (Bia). After drying, the films were peeled off and analyzed. The thickness of the film was measured with a micrometer

(Mitutoyo, Japon). Five readings were taken at random positions around the film, and their average represented the film thickness.

### III.2.3 Sample preparation for $\text{SCN}^-$ and $\text{OSCN}^-$ , $\text{OI}^-$ analyses

Films peeled from Petri dishes were homogenized (Ultra-Turrax T25, Germany) at 300 rpm for 1 min in 250 mL cold water (4°C). The homogenate was filtered through a syringe filter (0.45 mm, PTFE, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), and the filtered homogenate was used as the sample for  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{OSCN}^-$ ,  $\text{OI}^-$  (Min et al, 2007).

#### III.2.3.1 $\text{SCN}^-$ analysis

[ $\text{SCN}^-$ ] concentration was determined by following a standard method (IDF 1988). Two mL of samples were mixed with 1.0 mL of a 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich) solution. Each mixture was allowed to stand for 30 min. One mL of the mixture was then mixed with 0.5 mL of the ferric nitrate reagent and the absorbance was measured at 460 nm by a spectrophotometer (UV-160, Shimadzu, Japan). A blank, composed of a mixture of 0.5 mL of ferric nitrate solution and 1.0 mL of water was used. Thiocyanate concentration was then determined by comparison with standard solutions of known  $\text{SCN}^-$  solutions.

#### III.2.3.2 $\text{OSCN}^-$ , $\text{OI}^-$ analysis

The concentration of [ $\text{OSCN}^-$ ,  $\text{OI}^-$ ] was determined by following the method describe by Min et al, (2007) based on the oxidation of the colored 5-thio-2-nitrobenzoic acid (Nbs) to the colorless 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) ( $\text{Nbs}_2$ ). A 20 mg amount of Nbs2 (SigmaAldrich) mixed in 50mL cold phosphate buffer (pH 7.2) with 0.1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (Sigma Aldrich) was reduced with 0.6 mM 2-mercaptoethanol, which was prepared by adding 1 mL of a freshly prepared solution of 42 mL 2-mercaptoethanol (SigmaAldrich) in 20 mL water, resulting in a 0.6 mM Nbs solution. The Nbs solution was prepared fresh daily and kept on ice. 0.5 mL of each sample was mixed with 0.5 mL cold buffered sodium chloride (pH 7.2), and then 125 mL of the 0.6 mM Nbs solution was added. The concentration of [ $\text{OSCN}^-$ ,  $\text{OI}^-$ ] was spectrophotometrically measured at 409 nm with water used as the blank. The concentration of [ $\text{OSCN}^-$ ,  $\text{OI}^-$ ] was calculated from the difference in absorbance between the sample and the control, prepared by mixing 1 mL buffered sodium chloride solution (pH 7.2) with 125 mL of the 0.6 mM Nbs solution, multiplied by the ratio of the final and



starting volumes divided by 0.01405 (the micromolar per centimeter extinction coefficient for Nbs) and all divided by 2 (Bosch et al, 2000).

#### **III.2.4 Antimicrobial properties of the chitosan film incorporating lactoperoxidase system**

*X. campestris* pv. *Mangiferae indicae* strains were grown at 28°C for 48 h on Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) medium. An isolated colony of strain was transferred to YPG (10 mL) and grown at 28°C overnight in broth medium. 50 mL of a suspension containing 107 CFU/mL of the strain were dropped at the center of the Petri dish containing YPGA and spread onto the agar surface with a sterile glass rod. After diffusion of the suspension in the medium, disks (1.2 cm diameter) aseptically cut from the investigated films, were placed in the center of the Petri dish. Petri dishes were stored at 4°C for 3 h before being incubated at 28°C for 48 h before measuring inhibition zones. Two sample films (1.5% chitosan-LPOS and 1.5% chitosan-LPOSI films) were tested and compared to control (1.5% chitosan film alone). The reported values at each time were the means of 3 replicates.

#### **III.2.5 Chitosan film permeability to gas (O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>)**

Oxygen and carbon dioxide permeability measurements were carried out according to the isostatic method described by Gontard, et al, (1996). The permeation cell (arranged in a climatic chamber) consisted of two stainless steel chambers separated by a film sample and placed in a thermostatic chamber. The pure oxygen was injected continually into one chamber, and pure dioxide carbon gas into the other. Pressures in the chambers were equalized and maintained at atmospheric pressure. At steady state (constant oxygen and carbon dioxide concentration), the permeate gas that passed through the film was deducted with a syringe and measured using a gas analyzer GC 800 (CE instrument, Italy) for oxygen and GC 1000 (Dani, Italy) for carbon dioxide. Flow rates were measured with an intelligent flowmeter ADM 1000 (J&W, USA).

Oxygen or carbon dioxide permeability (P) was calculated as follows:

$$P = J (\Delta X) / A (\Delta p)$$

With P in amol/m s Pa (amol is 10<sup>-18</sup> mol). J is the flow of oxygen or carbon dioxide though the film (in amol/s), Dx is the film thickness (m), Dp is the differential partial

pressure across the film (Pa), and A is the surface area of the film (m<sup>2</sup>). Three replicates of each film were tested.

### III.2.6 Chitosan film permeability to water vapor (WVP)

WVP was determined according to the ASTM method E 96-00 (ASTM 2000). It is a gravimetric method based on the follow of the water mass permeation over time. Aluminum cups (7 cm diameter and 2 cm deep) containing 10 g of anhydrous CaCl<sub>2</sub> (0% R.H) were covered by film samples of 38.48 cm<sup>2</sup> area. The cups were placed in a climatic chamber with controlled temperature and humidity respectively at 23±1°C / 75±5% RH. Weight loss graphs were plotted with respect to time, and the linear least-square method was used to calculate water vapor transmission rate (WVTR) using the equation:

WVTR = slope/film area.

WVP was calculated from **WVP = WVTR.L/ΔP**. Where water vapor transmission rate (WVTR) is the slope/film area (g/m<sup>2</sup> J), L is the film thickness (mm), and DP is the partial water vapor pressure difference (kPa) between the two sides of the film.

### III.2.7 Experimental design and data analysis

The experimental design of Doehlert (1970) was chosen for this study. That mathematical tool was chosen to replace the traditional kinetic in order to study the interaction between factors and to obtain the maximum of information and precision from a reduced number of experiments. Determination of variable values and the total experimental number was inherent to the software (Statistica 7). The design variables selected in this study with actual and coded levels along with response variables are given in Tableau 2. The total experiment number (N) for 2 factors (k) was 9 including three duplicates of the center of the design. Experiments were carried out according to the design points with independent variables such as chitosan (x<sub>1</sub>), and glycerol quantity (x<sub>2</sub>). A quadratic model was applied to analyze the effect of independent variables on response parameters [SCN], and [OSCN, OI] by matching the responses studied (Y) with the code factors (x<sub>i</sub>, i=1,..) using the polynomial model associated with experimental design (Khuri and Cornell 1987).

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n b_{ij} x_i x_j$$

$b_0$  was the constant coefficient,  $b_i$  were the first order linear coefficients,  $b_{ii}$  were the quadratic coefficients and  $b_{ij}$  the second order interaction coefficients. Data analysis, analysis of variance and multilinear regression including responses optimization and desirability were performed by using Statistica 7 software.

Response surface graphs were obtained from the regression equation in coded levels of variables, keeping the response function on the Z axis with X and Y axes representing the independent variable.

### **III.3 Results and discussion**

#### **III.3.1 [SCN<sup>-</sup>] and [OSCN<sup>-</sup>, OI<sup>-</sup>] analysis**

Tableau 1 shows the production of [OSCN<sup>-</sup>, OI<sup>-</sup>] and [SCN<sup>-</sup>]. The values of the concentration of [SCN<sup>-</sup>] were around 0, with a maximum of 0.13 mM corresponding to 10 C and 75% RH. SCN<sup>-</sup> disappeared after two days. SCN<sup>-</sup> is an intermediate product which shows the antibacterial activity. But it is a short-lived product (Naidu, 2000) that will be oxidized to give OSCN<sup>-</sup>. The concentration of [OSCN<sup>-</sup>, OI<sup>-</sup>] was between 6.833 and 17.402 mM. These values are sufficient to kill many pathogens. Valerie and Reiter (1980) showed that 5 mM OSCN<sup>-</sup> was sufficient to kill *E. coli* in 2 h.

**Tableau 1: Doehlert experimental design for the dependent and independent variables used in formulation of chitosan films incorporating the lactoperoxidase system**

Trials	Independent variables						Dependent variables	
	Temperature (°C)		Relative humidity (%)		Storage period (days)		[OSCN <sup>+</sup> +OI] (μM)	[SCN <sup>-</sup> ] (mM)
	Coded values	Coded reel	Coded values	Coded reel	Coded values	Coded reel		
<b>1</b>	1	30	0	75	0	5	16.08	0
<b>2</b>	-1	10	0	75	0	5	6.83	0.13
<b>3</b>	0.5	25	0.866	90	0	5	13.52	0
<b>4</b>	-0.5	15	-0.866	53	0	5	7.86	0
<b>5</b>	0.5	25	-0.866	53	0	5	12.17	0
<b>6</b>	-0.5	20	0.866	90	0	5	8.40	0
<b>7</b>	0.5	15	0.289	82	0.816	10	10.75	0
<b>8</b>	-0.5	20	-0.289	69	-0.816	2	10.12	0.08
<b>9</b>	0.5	20	-0.289	69	-0.816	2	17.40	0
<b>10</b>	0	20	0.577	90	-0.816	2	17.01	0
<b>11</b>	-0.5	20	0.289	82	0.816	10	6.15	0
<b>12</b>	0	20	-0.577	61	0.816	10	13.70	0
<b>13</b>	0	20	0	75	0	5	16.44	0
<b>14</b>	0	20	0	75	0	5	16.49	0
<b>15</b>	0	20	0	75	0	5	16.47	0



**Tableau 2:** Analysis of variance on the effect of storage conditions on [OSCN<sup>-</sup>+OI<sup>-</sup>] parameters of chitosan film incorporating the lactoperoxidase system and their significance levels (T°. RH (%) and storage days

	Effect	Er. Type	t(5)	-95%	+95%
Moy/Ord.Orig	16.47	0.48	34.56***	15.24	17.69
T	9.9513	0.82	12.05***	7.83	12.07
T <sup>2</sup>	-10.02	1.51	-6.65 **	-13.90	-6.14
RH	0.2064	0.71	0.29	-1.63	2.04
RH <sup>2</sup>	-9.45	1.13	-8.36***	-12.36	-6.55
d	-4.64	0.67	-6.89***	-6.38	-2.91
d <sup>2</sup>	-4.11	0.95	-4.32**	-6.57	-1.66
T*RH	0.8180	1.65	0.50	-3.42	5.061
T*d	-2.96	1.74	-1.70	-7.43	1.52
RH*tps	-9.14	1.50	-6.06**	-13.02	-5.26

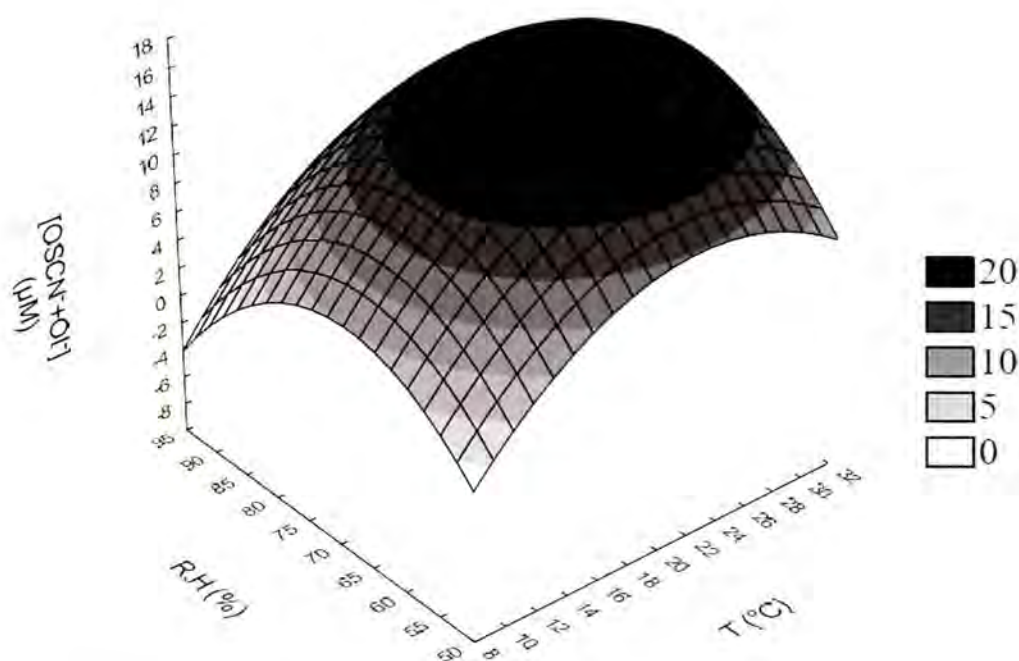
\*\*\* P < 0.001 ; \*\* P<0.01 ; \* P<0.05 ; R<sup>2</sup>=0.98

T = temperature (°C)

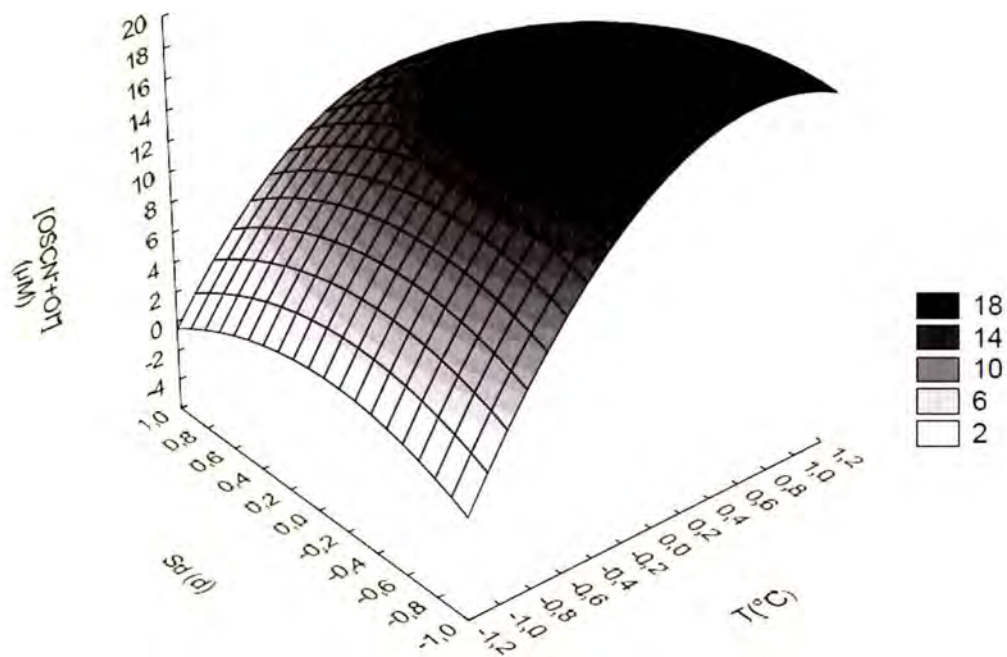
RH = relative humidity (%)

**Tableau 2** shows the analysis of variance, indicating the influence of drying conditions on the production of [OSCN<sup>-</sup>, OI<sup>-</sup>]. The value of R<sup>2</sup> ¼ 0.98 indicates that the model fits the data correctly. The temperature and storage days were the important factors in this experiment for their significant values of the linear and quadratic effects (P < 0.5). Regarding the moisture, only its quadratic effect was significant. The concentration of [OSCN<sup>-</sup>, OI<sup>-</sup>] were positively affected by linear term and negatively influenced by the quadratic term of temperature. Also, it was influenced negatively by the individually term of the time, and by the interaction

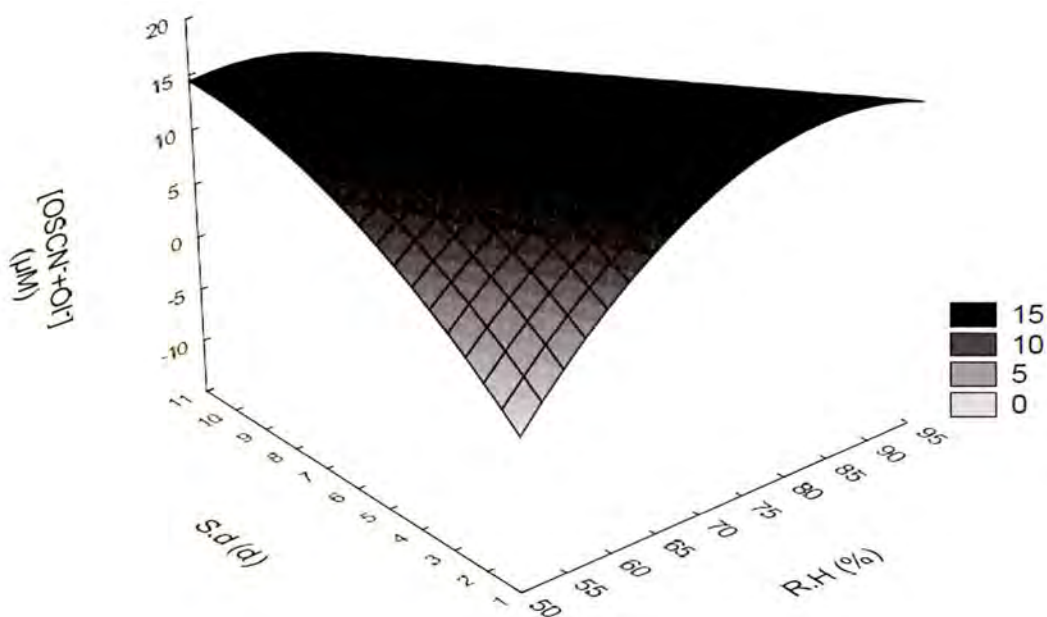
humidity-time. In order to better understand the individual and the interaction of the temperature, humidity relative and storage time on the concentration of  $[\text{OSCN}^-, \text{OI}^-]$ , the surfaces responses plots were analyzed. Fig.1 shows the three dimensional surface response plot of  $[\text{OSCN}^-, \text{OI}^-]$  vs temperature and relative humidity. From this figure, it is possible to observe that the concentration of  $[\text{OSCN}^-, \text{OI}^-]$  went up with the temperature increase to reach a maximum around 25°C. This was due to the speed of chemical reactions, which generally increase with temperature due to the kinetic energy supplied to the molecules that increases the number of effective collisions leading to reaction products. The optimum temperature of our enzyme system to produce sufficient  $[\text{OSCN}^-, \text{OI}^-]$  was around 25°C. Adolphe et al. (2006) showed that LPOS was more efficient at 25°C than at 4°C. Fig. 2 shows the individual effect of the temperature and storage time. It can be seen that the concentration of  $[\text{OSCN}^-, \text{OI}^-]$  increased with the increase of temperature but decreased when the storage time increased. This effect of storage time on the concentration of  $[\text{OSCN}^-, \text{OI}^-]$  was strengthened when the relative humidity increased from 4.11 to 9.14 mM (Tableau 2, Fig. 3).



**Figure 1:** Effect of the temperature and relative humidity on  $\text{OSCN}^- + \text{OI}^-$  on chitosan-LPOS composite film



**Figure 2:** Effect of the temperature and storage days on  $\text{OSCN}^- + \text{OI}^-$  on chitosan-LPOS composite film



**Figure 3:** Effect of R.H and storage days on  $\text{OSCN}^- + \text{OI}^-$  on chitosan-LPOS composite film

### III.3.2 Effect of LPOS-chitosan on *X. campestris* pv. *mangifera indica*

Disc films with chitosan alone did not show any inhibition zone, but the discs were not invaded by bacteria (Tableau 3). This result showed that the chitosan used had a bacteriostatic effect against *X. campestris*. The antibacterial effect of chitosan against *X. campestris* strains has been also demonstrated by Bin, et al, (2008). They showed also that chitosan at 0.1 mg/mL had a bactericidal effect against strains of *Xanthomonas* isolated from *Euphorbia pulcherrima*. The antimicrobial effect against bacterial strains was influenced by the concentration of chitosan (Liu et al, 2006), the degree of deacetylation and the molecular weight of the chitosan (Devlieghere et al, 2004). According to several studies, this antimicrobial activity could be due to the interaction between the positively charged molecules of chitosan and the negative residual charge on the surface of bacterial cells. This interaction plays a crucial role in the inhibitory effect of chitosan on Gram-negative bacteria (Helander et al, 2001).

Regarding the presence of LPOS or LPOSI fixed to chitosan film, there was an inhibition zone around the disc film (Tableau 3 and Fig. 4). The inhibition zones around the disc indicated that *X. campestris* was sensitive to the film incorporating the lactoperoxidase system. No significant difference was observed with iodine or without iodine coupled to chitosan (Tableau 3). It has been previously shown by Bosch et al. (Bosch et al, 2000) that iodine combined with LPOS had a differential influence on bacteria strain growth. It can increase the inhibitory action against *E. coli* and *S. aureus*, but had no action against some strains of *Pseudomonas aeruginosa*. The effectiveness of the LPOS against various pathogenic strains has been demonstrated by several authors (Min et al, 2005; Nguyen et al, 2005).





1.5% Chitosan



1.5% chitosan-LPOS



1.5% chitosan-LPOSI

**Figure:4 Antimicrobial effect of chitosan films with or without lactoperoxidase system against *X. campestris pv. mangifera indica*.**

### III.3.3 Influence of LPOSI on chitosan film permeability to water and gases

Gases and water vapor barrier properties of the chitosan films were not significantly affected by the incorporation of the Lactoperoxidase system ( $P < 0.05$ ) (Tableau 3). Adding LPOSI had no significant effect on the gas barrier properties of our film. This result was also demonstrated by Min and Krochta (2005) with LPOS incorporated in whey protein films, and (Park et al, 2004), lysozyme incorporated in chitosan composite film.

**Tableau 3:** Gas barrier, water, and antibacterial properties against *Xanthomonas campestris pv mangifera indica*, of chitosan-LPOS composite film

	Chitosan	Chitosan-LPOSI	Chitosan-LPOS
PCO <sub>2</sub> (amol.m/m <sup>2</sup> s.Pa)	1193.223 <sup>a</sup>	1058.775 <sup>a</sup>	ND
PO <sub>2</sub> (amol.m/m <sup>2</sup> s.Pa)	3268.735 <sup>a</sup>	3580.793 <sup>a</sup>	ND
WVP (10 <sup>-5</sup> gmm <sup>2</sup> JPa)	7.582 <sup>a</sup>	8.633 <sup>a</sup>	ND
Diameter of inhibition zone (cm)	1.2 ± 0 <sup>a</sup>	3.03 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.93 ± 0.18 <sup>b</sup>

### III.3.4 Conclusions

This study demonstrated that chitosan-based film matrix can effectively carry lactoperoxidase system with the aim to develop chitosan-LPOS composite films. The antimicrobial efficacy of this system was influenced by temperature and storage duration. The films were more efficient when they were made at 25 °C for 5 days. Chitosan film incorporating LPOS or LPOSI had a bactericidal effect against *X. campestris pv. mangifera indica* but presence of I did not influence antimicrobial activity of LPOS. Addition of LPOS into chitosan solution enhanced antimicrobial function of films without altering moisture and gas barrier characteristics of the chitosan films.

**CHAPITRE IV**

**LES PROPRIETES ANTIMICROBIENNES ET PHYSIQUES DES FILMS DE  
CHITOSANE ENRICHIS PAR LE SYSTEME LACTOPEROXYDASE**

Il a été question d'étudier l'interaction entre la concentration de chitosane et la fixation du système enzymatique.

## Résumé

Dans ce chapitre, les systèmes enzymatiques avec/sans l'iode (LPOSI/LPOS) incorporés dans trois concentrations de chitosane (0,5 ; 1 et 1,5%) ont été étudiés. Le but était d'étudier la synergie entre l'activité antimicrobienne des systèmes lactoperoxydases et les concentrations des différents films de chitosane.

Les films obtenus ont été testés sur l'inhibition des souches phytopathogènes : *Xanthomonas campestris*, pv. *Mangifera indica*, *Colletotrichum gloeosporioides* (C. 64, C. 4612 et C. 62) et *Lasiodiplodia theobroma ngr 05A*. La perméabilité à la vapeur d'eau et les propriétés mécaniques des différents films ont été étudiées. Les effets antimicrobiens obtenus par la technique du diamètre des disques ont indiqué que les concentrations de chitosane de 1 et 1,5% (p/p) enrichis aux systèmes lactoperoxydases (LPOS et LPOSI) inhibaient significativement la croissance des souches testées. Ces films possédaient une activité bactéricide contre la souche *X. campestris*, pv. *Mangifera indica* et une activité fongicide contre les souches *C. gloeosporioides* C64 et *L. theobroma*. Par contre ils possédaient un effet fongistatique contre les souches *C. gloeosporioides* C4612 et C 62. Les films de chitosane de 0,5% incorporés par les systèmes enzymatiques et les films à différentes concentrations ne contenant pas les systèmes lactoperoxydases ont montré une faible activité antimicrobienne contre les souches. Les propriétés des films de chitosane n'ont pas été influencées significativement par la présence des systèmes enzymatiques.



## Antimicrobial and physical properties of edible chitosan films enhanced by lactoperoxidase system

---

Cissé Mohamed, Kouakou Amenan Clementine, Montet Didier, Loiseau Gérard,  
Ducamp-Collin Marie Noëlle

**Food Hydrocolloids:** Ms. Ref. No.: FOODHYD-D-12-00084

**Received:**

**Accepted :** accepté sous condition de corrections majeures.

---

### Abstract

Lactoperoxidase systems with/without iodine (LPOSI / LPOS) incorporated into three concentrations of chitosan (0.5, 1 and 1.5%) were studied. Antimicrobial effect of chitosan and the synergy between the antimicrobial activity of lactoperoxidase systems and different concentrations of chitosan films obtained were tested on the inhibition of phytopathogenic strains: *Xanthomonas campestris* pv. *Mangifera indica*, *Colletotrichum gloeosporioides* (C. 64, C. 4612 and C. 62) and *Lasiodiplodia theobroma* ngr 05. The permeability to water vapor and mechanical properties of the films were studied. The antimicrobial effects obtained by the technique of disc diameter indicated that chitosan at 1.5 % without enzyme possessed antifungal activity. Concentrations of chitosan at 1 and 1.5% (w / w) enhanced to lactoperoxidases systems (LPOS and LPOSI) inhibited significantly the growth of strains tested. These films had a bactericidal activity against strain *X. campestris* pv. *Mangifera indica* and fungicidal activity against strains *gloeosporioides* C. C64 and *L. theobroma*, while they had fungistatic activity on C. 62 and C. 4612. The properties of chitosan films were not significantly influenced by the presence of enzyme systems.

**Keywords:** *Xanthomonas campestris*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobroma*, lactoperoxidase system, edible chitosan film, mangoes

#### IV.1 Introduction

Incorporation of natural antimicrobial substances in the packaging film is an alternative to reduce the chemical substances use in food preservation. These antimicrobial-enhanced packaging films can ensure the safety of food surfaces through controlled release of antimicrobial substances from the carrier film structure to food surface.

The antimicrobial compounds and their incorporation into packaging materials have been well reviewed (Han 2000; Appendini and Hotchkiss 2002; Park et al, 2004). These films have advantages over the direct application of antibacterial agents onto food, because edible films can be designed to slow antimicrobial diffusion to the surface of food (Han 2000; Dawson et al, 2002; Sebtì and Coma 2002). Therefore, smaller amounts of antimicrobials would be needed in edible films to achieve a target shelf life, compared with direct application of antimicrobial agents on the food surface. Much research has focused on the discovery of new natural antimicrobials to be incorporated into edible films. Several compounds have been proposed for their antimicrobial activity in food, as organic acids (Siragusa and Dickson 1992), enzymes (Park et al, 2004), or bacteriocins (Dean and Zottola 1996).

Lactoperoxidase System (LPOS) possesses a broad antimicrobial spectrum and could be used in food packaging. This enzyme showed a bactericidal effect on Gram-negative bacteria and a bacteriostatic effect on Gram-positive bacteria (Seifu et al, 2005). Also, it has antifungal (Jacob et al, 2000) and antiviral activity. The LPOS consists of 3 components: lactoperoxydase (LPO), thiocyanate (OSN), and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). The enzyme catalyzes the oxidation of thiocyanate ( $SCN^-$ ) by using  $H_2O_2$  and generates intermediate antimicrobial products such as hypothiocyanite ( $OSCN^-$ ) and hypothiocyanous acid (HOSCN). These highly reactive compounds inhibit microorganisms by the oxidation of the sulphhydryl groups (Liu, et al., 2006) of their enzymes and proteins (Kussendrager and Hooijdonk 2000). Addition of iodide to thiocyanate increased the fungicidal and bactericidal effect against microbes like *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (Bosch et al, 2000). Many fungi are killed by LPOS with iodine as the electron donor. The addition of LPOS in a polymeric supporting matrix by immobilization, absorption, or entrapment has been reported in pharmaceutical and food-related areas. Efficacy of LPOS has been evaluated after immobilizing into whey protein (Min and Krochta 2005; Min et al, 2007) and into Cross-Linked Alginate Films (Fatih et al, 2009).

Chitosan is a natural nontoxic biopolymer (poly-glucose-acetylamine) derived from partial or total deacetylation of chitin, a major component of the shells of crustacea such as crab, shrimp, and crawfish. In recent years, applications of chitosan to the fields of medicine, food, chemical engineering, pharmaceuticals, nutrition, environmental protection and agriculture have received considerable attention (Chung et al, 2003; Devlieghere et al, 2004; Li et al, 2007). Applications of chitosan in environmental protection and agriculture include its use as a biocontrol agent for controlling plant disease (Atia et al, 2005; Li et al, 2008).

Chitosan has been reported to reduce the infection of *Fusarium oxysporum f. sp. apii* in celery (Bell et al, 1998) and inhibited the spread of *Sphaerotheca pannosa var. rosae*, *Peronospora sparsa* and *Botrytis cinerea* on roses (Ben-Shalom and Fallik 2003). Treating tomato plants with chitosan solution reduced mycelia growth, sporangial production, and release of zoospores and germination of cysts of *Phytophthora infestans*, which resulted in significant disease protection (Atia et al, 2005). In addition, chitosan seed treatment could permit to reduce *Colletotrichum sp.* infection and improve performance of chili seedling (Photchanachai et al, 2006). Chitosan can effectively fix certain enzymes such as lysozyme (Park et al, 2004), nisin (Li et al, 2006), lactoperoxidase system (Cissé et al, 2012) and organic or inorganic acids (Hamdine et al, 2005).

The goal of this study was to develop an antimicrobial chitosan film enhanced with lactoperoxidase system, able to preserve fruits and vegetables during a post-harvest longer time. Antimicrobial activity of LPOS with and without iodide incorporated into different chitosan concentration has been tested against different phytopathogenic microorganisms such as *Xanthomonas campestris, pv. Mangifera indica*, the causal agent of bacterial black spot in mangoes (Nakasome and Paull 1998; Gagnevin and Pruvost 2001), *Lasioidiplodia theobroma*, the causal agent of stem-end rot disease (Moalemiyan et al, 2007; Sivakumar et al, 2011), and *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of anthracnose disease in fruits (Moalemiyan et al, 2007; Kefialew and Ayalew 2008; Yenjit et al, 2010).

## IV.2 Materials and Methods

LPOS was composed of lactoperoxydase (LPO; 140 U/mg, Bioserae, France), glucose oxidase (GO; 158.9 U/mg, Sigma-Aldrich); D (+) glucose (Glu, Sigma-Aldrich), potassium thiocyanate (KSCN, Bioserae, France), and or not potassium iodide (KI, Fluka). Chitosan (>90% DDA viscosity 500-2000 cps) was obtained from France Chitin (Marseille, France). Glycerol, used as a plasticizer to improve coating flexibility, was purchased from Fisher Scientific Inc. (Fair Lawn, NJ). *Xanthomonas campestris*, pv. *Mangifera indica* was obtained from the Collection Française de Bactérie Phytopathogène (CFBP, INRA, France). The 3 strains of *Colletotrichum gloeosporioides* were isolated by CIRAD, UMR Qualisud and *Lasiodiplodia theobroma ngr 05A* was given by CIRAD, UMR BGPI Montpellier-France.

### IV.2.1 Preparation of chitosan film forming solutions

Chitosan solutions were prepared by dissolving chitosan flakes (0.5; 1 and 1.5 g) in distilled water (80 mL) containing 0.7 mL of lactic acid (Sigma) under agitation using a magnetic stirrer incubated at room temperature (22°C) overnight. The pH of the solution was adjusted to 5.5 with 0.46 M  $K_2HPO_4$  (Sigma-Aldrich) and the solution was completed to 100 mL with distilled water. Glycerol (25% p/p of chitosan) was added and the solution was stirred for 30 min.

### IV.2.2 Preparation of LPOS

The weight ratios of the LPOS components were 1.00; 0.35; 108.70; 1.09 and 2.17 respectively for LPO, GO, Glu, KSCN, and KI. The composition was adapted from Min and Krochta (2005). The components were dissolved separately in 50 mL phosphate buffer (pH 6.2) and 15.5 mg of LPO was added. LPOS solution was incubated at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  for 24 h under shaking at  $160 \text{ rev.min}^{-1}$  using a water bath shaker (Julabo SW 20 Silab, France) to increase the antimicrobial activity of LPOS (Bosch et al, 2000; Min et al, 2007). Two solutions were prepared: solution with iodine (LPOSI) and solution without iodine (LPOS).

### IV.2.3 Chitosan-LPOS film preparation

Chitosan films incorporating LPOS (LPOS-chitosan films) were prepared by adding LPOS to different chitosan solutions (0.5%; 1% and 1.5%). LPOS concentration in the chitosan film-forming solution was 5% (v/v). After 30 min of stirring, chitosan-



LPOS solution (10 g) were poured into Petri dishes (9 cm of diameter) and dried in a controlled temperature chamber (Bia climatic, Ste Honorine France) at  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $75\% \pm 5 \text{ RH}$  for 24 h. After drying, the films were exposed to UV for 15 min before use. The thickness of the film was measured with a micrometer (Mitutoyo, Japon). Five readings were taken at random positions around the film, and their average represented the film thickness.

#### **IV.2.4 Inoculation techniques**

##### **IV.2.4.1 Determination of bacterial inhibition zone by spreading technique on Petri dish**

50  $\mu\text{L}$  of the colony suspension of *Xanthomonas campestris*, pv. *Mangifera indica* containing  $10^7$  CFU/mL were dropped at the center of the Petri dish containing LPGA (yeast extract, peptone, glucose and agar) and spread onto the agar surface with a sterile glass rod. After diffusion of the suspension in the medium, a sample of film (1.2 cm of diameter) was placed in the center of the Petri dish. Petri dishes were stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for 3h before being incubated at  $28^{\circ}\text{C}$ . Inhibition zones were measured after 7 and 14 days.

##### **IV.2.4.2 Determination of radial growth by puncture technique**

3  $\mu\text{L}$  of the inoculum containing  $10^5$  spores/mL were dropped at the center of the Petri dish containing potato dextrose agar (PDA) for *C. gloeosporioides* and malt agar for *L. theobroma*. After diffusion of the suspension in agar, film sample (1.2 cm of diameter) was placed at the center of Petri dish to cover the suspension. The Petri dishes were stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for 3h before being incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  for *Colletotrichum gloeosporioides* and at room temperature with natural light for *Lasiodiplodia theobroma*. After 7 and 10 days of incubation respectively for *Colletotrichum gloeosporioides* strains and for *Lasiodiplodia theobroma*, the mycelium diameters of the inhibition zone were manually measured and compared to the control (without film) where the mycelium reached the edge of the plate. The fungicide index (%) was obtained by the formula: Fungistatic index (%) =  $1 - (D_s/D_c) \times 100$ , where  $D_s$  is the diameter of the growth zone in the test plates and  $D_c$  is the diameter of growth zone in the control plate (Martínez-Camacho et al, 2010).

#### IV.2.5 Water vapor permeability (WVP)

WVP was determined according to the ASTM gravimetric method E 96-00 (2000). Aluminum cups (7 cm diameter and 2 cm deep) containing 10 g of anhydrous  $\text{CaCl}_2$  (0% RH) were covered by film samples of  $38.48 \text{ cm}^2$  area and isolated with wax at the edges. The cups were placed in a climatic chamber with controlled temperature and humidity respectively at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  /  $75 \pm 5\%$  RH. Weight loss graphs were plotted with respect to time, and the linear least-square method was used to calculate water vapor transmission rate (WVTR) using the equation:  $\text{WVTR} = \text{slope}/\text{film area}$ .

WVP was calculated from  $\text{WVP} = \text{WVTR} \cdot L / \Delta P$  where water vapor transmission rate (WVTR) is the slope/film area ( $\text{g}/\text{m}^2\text{J}$ ),  $L$  is the film thickness (mm), and  $\Delta P$  is the partial water vapor pressure difference (kPa) between the two sides of the film.

$\text{WVP} = \text{WVTR} \cdot L / \Delta P$  where water vapor transmission rate (WVTR) is the slope/film area ( $\text{g}/\text{m}^2\text{J}$ ),  $L$  is the film thickness and  $\Delta p$  is the partial water vapor pressure difference (kPa) between the two sides of the film.

#### IV.2.6 Mechanical properties

Tensile strength (TS) and % elongation at break (A) were determined according to ASTM method D 882 (ASTM 2001) with a texturometer TAXTplus (5kg) (Instron Co., Canton, MA, USA). Initial grip separation and cross-head speed were set at 10 mm and 0.3 mm/sec respectively. Strips of film samples ( $7\text{cm} \times 1\text{cm}$ ) were analyzed. T.S was calculated by dividing the maximum load by the initial cross-sectional area of the sample and expressed in MPa. The ratio A (%) was calculated as the elongation at the rupture point of sample to the initial length of a sample as a percentage.

#### IV.3 Results and discussion

Each experiment was performed in triplicate. Data were analyzed by 1-way analysis of variance (ANOVA) using Statistica 7 with Scheffe method. Results with  $P < 0.05$  were considered.

##### IV.3.1 Effect of chitosan-LPOS on *Xanthomonas campestris* pv *mangifera indica*

The results are summarized in Tableau 1 and shown by Figure 3. Chitosan concentrations of 0.5 and 1% did not show any inhibition zone on *Xanthomonas campestris*. Inoculated bacteria grew on all the surface of Petri plate, even on the film disc. Chitosan concentration of 1.5% showed no inhibition zone, but the film disc has

not been invaded by bacteria after 7 days. It was invaded completely after 14 days. In view of these results, we could affirm that chitosan at 0.5 and 1% had no antibacterial activity against *X. campestris pv mangifera indica* while, chitosan concentration of 1.5% had a bacteriostatic effect against these bacteria. The effect of chitosan against *X. campestris* strains has been also demonstrated by Bin et al. (2008) and is known to be influenced by the concentration of chitosan (Liu et al, 2006). According to several studies, this antimicrobial activity could be due to the interaction between the positively charged molecules of chitosan at acidic pH and the negative residual charge on the surface of bacterial cells. This interaction plays a crucial role in the inhibitory effect of chitosan on Gram negative bacteria (Helander et al, 2001). Bin et al. (2008) showed that chitosan (0.1 mg/mL) had a bactericidal effect against *Xanthomonas* strains isolated from *Euphorbia pulcherrima*. In the case of our study, concentration of chitosan at 1.5% had a bacteriostatic effect. The difference in observed actions could be due to the difference in the degree of deacetylation and the molecular weight of the chitosan used compared to ours.

Regarding the presence of LPOS fixed to chitosan at different concentrations, there was an inhibition zone around the disc diameters for all concentrations of chitosan (0.5, 1, and 1.5%). With LPOSI added, chitosan concentrations of 1 and 1.5% showed an inhibition zone, while chitosan concentration of 0.5% showed nothing (Tableau 1). The inhibition zones around the disk indicated that *X. campestris* was sensitive to the film incorporating the lactoperoxydase system. Effectiveness of the LPOS against various pathogenic strains has been also demonstrated by several authors (Min et al, 2005; Nguyen et al, 2005).

Effectiveness of the presence of iodine in the enzyme system depended of the concentration of chitosan used. It was best with 1 and 1.5% chitosan concentration and ineffective with 0.5 % chitosan concentration against *X. campestris pv mangifera indica*.

The difference of inhibition observed between LPOS or LPOSI coupled to chitosan at 1% (w/w) and that observed between LPOS or LPOSI coupled to chitosan at 1.5% (w/w) was not significant (Tableau 1). It has been previously shown by Bosch et al. (2000) that iodine combined with LPOS had a differential influence on bacteria strain growth. They demonstrated that the Gram-negative *P. aeruginosa* could be completely inhibited within 4 h of contact time in the LPOS with or without iodide. *E. coli* and the Gram-positive *Staphylococcus aureus* were much more sensitive to the

LPOS with iodine than without iodine. Pruitt and Reiter (1985) reported that Gram-positive bacteria are more susceptible to LPOS without iodine than Gram-negative bacteria. In this investigation we observed that the Gram-negative *Xanthomonas campestris* was completely inhibited by contact of LPOS with or without iodide fixed to 1 and 1.5% of chitosan (w/w).

**Tableau 1:** Antifungal and mechanical properties of chitosan-LPOS films

	Inhibition diameter (cm)		WVT (10 <sup>-6</sup> gm/m <sup>2</sup> JPa)	A (%)	T.S (MPa)
	7 days	14 days			
<b>Chitosan concentration</b>					
<b>0.5</b>	0.00 ± 0a	0.00 ± 0a	7,89±2,02 <sup>a</sup>	26,453 ± 1,28 <sub>a</sub>	388,42 ± 49 <sup>a</sup>
<b>1</b>	0.00 ± 0a	0.00 ± 0a	5,84 ± 1.03 <sup>a</sup>	20,39 ± 1.36 <sup>b</sup>	556,84 ± 51 <sup>b</sup>
<b>1.5</b>	1.2 ± 0a	0.00 ± 0a	7,55 ± 0.08 <sup>a</sup>	10.54 ± 1.7 <sup>c</sup>	856,87 ± 63 <sup>c</sup>
<b>Chitosan /LPOS concentration</b>					
<b>0.5/5</b>	2.72 ± 0.32a	2.66 ± 0.37a	7,74±0,2 5 <sup>a</sup>	24, 68±2.21 <sup>a</sup>	297.26±46 <sup>a</sup>
<b>1/5</b>	3.25 ± 0.11a	3.23 ± 0.05a	5,61 ± 0.31 <sup>a</sup>	18.3 1± 3.4 <sup>b</sup>	574.42± 33.93 <sup>b</sup>
<b>1.5/5</b>	2.93 ± 0.18a	2.875 ± 0.02a	8,42 ± 0.91 <sup>a</sup>	10.71 ± 3.09 <sup>c</sup>	838 ± 105 <sup>c</sup>
<b>Chitosan /LPOSI concentration</b>					
<b>0.5/5</b>	0.00 ± 0a	0.00 ± 0a	6,85±0,47 <sup>a</sup>	19,35±0,87 <sup>a</sup>	349,32±71 <sup>a</sup>
<b>1/5</b>	3.05 ± 0.09b	3.02 ± 0.08b	6,00 ± 0.41 <sup>a</sup>	17.80 ± 1 <sup>a</sup>	580 ± 67 <sup>b</sup>
<b>1.5/5</b>	3.03 ± 0.07b	2.97 ± 0.3b	8,02 ± 0.27 <sup>a</sup>	8.37 ± 1.73 <sup>b</sup>	977.88 ± 19 <sup>c</sup>

#### IV.3.2 Effect of chitosan-LPOS on moulds

Results (Fig 1) showed that fungi strains reacted differently towards chitosan on one hand and chitosan-coupled enzyme system on the other hand. After 7 days of culture of *Colletotrichum gloeosporioides* and 10 days for *Lasiodiplodia theobromae* ngr 05 (minimum days which mycelium on the control plate reached the edge of the plate), we observed that concentrations of 0.5 and 1% chitosan had low fungistatic effect against these different fungi. For the concentration of 1.5%, the fungistatic index



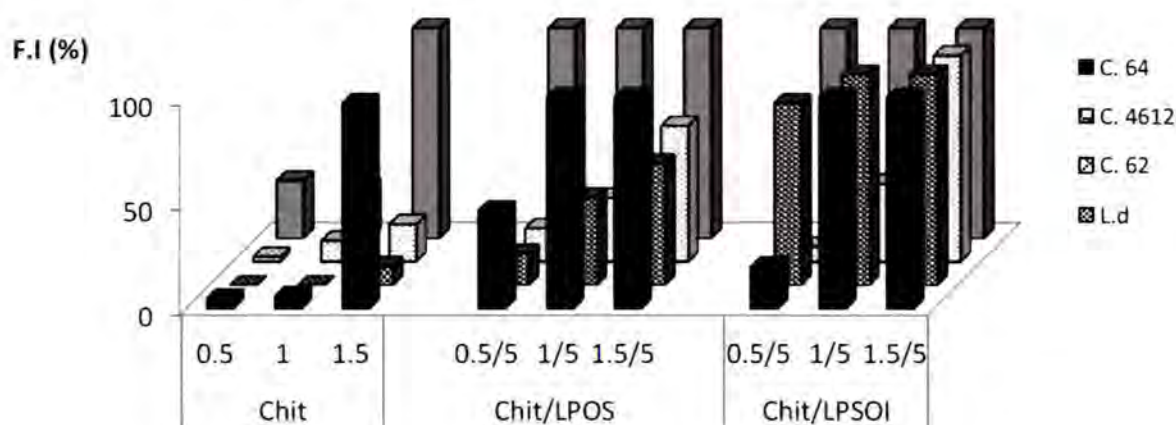
varied according to the strains tested. It had a high index fungistatic, about 100% for *C. gloeosporioides* C64 and *Lasiodiplodia ngr 05*, and a low index against *C. gloeosporioides* C4612 and C62 less than 9 % and 18 % respectively (Fig. 1). These results indicated that chitosan at 1.5 % (w/w) had antifungal activity against C64 and *Lasiodiplodia ngr 05*. After 14 days of incubation for *C. gloeosporioides*, the fungistatic index of all concentrations (0.5, 1, and 1.5 %) was equal to 0% for all strains of *Colletotrichum gloeosporioides*, and 28% for *Lasiodiplodia ngr 05* after 20 days of incubation (Fig. 2). Results showed that chitosan had fungistatic activity against these strains. Fungistatic activity of chitosan has been also demonstrated by several authors. Abd-Alla & Wafaa, (2010) and Ana et al. (2010) showed that chitosan concentration was correlated directly with its inhibitory effect. However, chitosan antimicrobial action was influenced by intrinsic factors such as the type of chitosan, the degree of chitosan polymerization, the host, the natural nutrient constituency, the chemical or nutrient composition of the substrates, and the environmental conditions (e.g., substrate water activity or moisture).

Benhamou et al, (1994) used chitosan in soil amendment for seed treatment and as a foliar treatment to control the fungus *Fusarium oxysporum*. When seed coating and soil amendment were performed with chitosan concentrations of 1 mg/mL, treatment induced a delay in disease development (root lesions visible after 4 days inoculation), emergence of wilting symptoms occurred between 7 and 10 days post-inoculation, while death of about 80% of the plants was recorded 1 week later. We observed the same with 1.5% chitosan. Between 7 and 14 days, there was no inhibition and all strains grown.

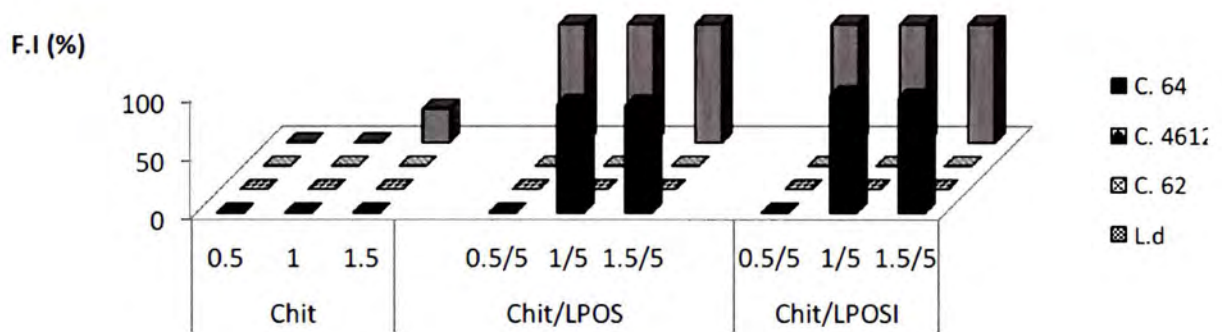
*C. gloeosporioides* C4612 and C62 resistance to chitosan indicated the strains variability of sensitivity towards chitosan. A similar difference of sensitivity of *Colletotrichum musae* strains was previously demonstrated by De Lapeyre and Dubois (1997) on the resistance of these strains exposed to Thiabendazol and by Sagoua (2009) towards for the same strain against LPOS system.

Concerning the coupling of enzyme to chitosan, high values of fungistatic index showed that LPOS with or without iodine had antifungal effect. Antifungal effects of LPOS were well documented. Min & Krochta (2005) reported that the *P. commune* growth was sensitive to the edible whey protein film incorporating with LPOS. Sagoua (2009) reported also LPOS antifungal effect against *Colletotrichum* strains.

Fig. 1 and 2 proved the sensibility of the strains towards antifungal molecules. *Lasiodiplodia ngr 05* seemed to be the most sensitive strain. After 10 days of culture, whatever the concentration of chitosan used for fixing the enzyme system, and the presence or absence of iodine, its fungicide index was 100%. After 20 days of culture, this inhibition index was still equal to 100%. *Colletotrichum* strains were also sensitive against the coupling, especially when the concentration of chitosan was 1 or 1.5%. *C. gloeosporioides* C64 remains the most sensitive compared to C4612 and C62. For C4612, the fungicides index of the coupling chitosan-LPOSI was superior to that of chitosan-LPOS. On the contrary for C62 and C46 strains the fungicide index of LPOS was almost equal to LPOSI. C4612 was more sensitive to the presence of iodine. C62 with the lowest fungicide index was the most resistant strain. This resistance of C62 was also demonstrated by Sagoua (2009). After 14 days of culture, the fungicide index of C62 and C4612 decreased to 0 %, while those of C64 remained almost constant for chitosan concentrations of 1 and 1.5% coupling with enzyme system. Our coupling chitosan-LPOS and chitosan-LPOSI had a fungicidal effect on C64 and *Lasiodiplodia ngr 05*. But they have a fungistatic effect on C4612 and C62.



**Figure 1:** Fungistatic activity of chitosan-LPOS on *C. gloeosporioides* sp (7 days) and *L. theobromae* (10 days)



**Figure 2:** Fungistatic activity of chitosan-LPOS on *C. gloeosporioides* sp (14 days) and *L. theobromae* (20 days)



**Fig 3a:** Activity of chitosan (0.5%) vs *Xanthomonas c.*



**Fig 3b:** Activity of chitosan (1%) vs *Xanthomonas c.*



**Fig 3c:** Activity of chitosan (1.5%) vs *Xanthomonas c.*



**Fig 3d:** Activity of chitosan (0.5%) & LPOS vs *Xanthomonas c.*



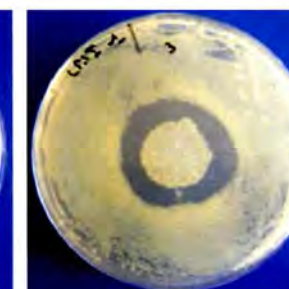
**Fig 3e:** Activity of chitosan (0.5%) & LPOS vs *Xanthomonas c.*



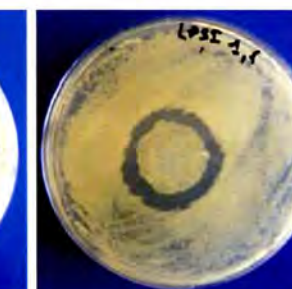
**Fig 3f:** Activity of chitosan (1.5%) & LPOS vs *Xanthomonas c.*



**Fig 3g:** Activity of chitosan (0.5%) & LPOSI vs *Xanthomonas c.*



**Fig 3h:** Activity of chitosan (0.5%) & LPOSI vs *Xanthomonas c.*



**Fig 3j:** Activity of chitosan (1.5%) & LPOSI vs *Xanthomonas c.*

**Figure 3 :** Anticicrobial effect of chitosane–LPOS edible film on *X. campestris pv mangifera indica*



#### **IV.3.3 Water vapor permeability and mechanical properties (Tensile strength and elongation at break)**

The permeability to water vapor is a key parameter to ensure the organoleptic qualities of food and the film capability to fight against dehydration or rehydration. Results of WVT are summarized in Tableau 1. Low values of WVT were due to the fact that chitosan films, like many other protein or polysaccharide edible films, exhibited relatively low water barrier characteristics due to their high hydrophilic nature. Results indicated also that the incorporation of LPOS with or not iodine did not significantly change the film structure. Park et al. (2004) reported similar results on chitosan incorporating LPOS.

The tensile strength (TS) values were positively influenced by the chitosan concentration while elongations at break (% A) were negatively influenced. TS increased while % A decreased, with increasing of the chitosan concentration. But mechanical properties (TS and %A) were not significantly affected by the incorporation of the enzyme system. This is in accordance with previous studies of Min et al. (2005) who incorporated different quantity of LPOS into chitosan and reported that mechanical properties were not significantly affected by the incorporation of LPOS at 0.03 and 0.06 g LPOS/g film. However, significant reductions in TS were observed with the films at > 0.15 g LPOS/g film, and a reduction in %A at 0.25 g LPOS/g film. Park et al. (2004) indicated that TS and % A of the chitosan films significantly decreased with the addition of lysozyme.

#### **IV.4 Conclusion**

The results of this research indicated that chitosan alone at high concentration (1.5%) had a bacteriostatic effect on *X. campestris pv mangifera indica*, *Colletotricum gloeosporioides* and *Lasiodiplodia theobromae*. When LPOS was coupled to chitosan film, there was a bacterial and fungal inhibitory effect. That effect was dependent upon the chitosan concentration and the considered fungal strain. Presence of enzyme system in chitosan solution did not influence mechanical and physical properties of the chitosan film. Presence of a second electron donor such as iodine could positively influence the antimicrobial effect of LPOS against some mango pathogens. It must be incorporate to 1 or 1.5 % of chitosan.



The results obtained in our study demonstrated that it was possible to incorporate active LPOS into chitosan edible film for mango packaging and coating to protect them against pathogens. Its use can help preventing the loss of mango due to fungi and bacteria during storage and transport.

**CHAPITRE V**

**EFFET ANTIFONGIQUE DU COUPLAGE CHITOSANE-LPOS SUR DES  
SOUCHES *Phomopsis sp.* RP257 ET *Pestalotiopsis sp* ISOLEES DES  
MANGUES**

**Isolement et identification des souches *Phomopsis sp.* RP257 et  
*Pestalotiopsis sp.* Isolement des souches de moisissures**  
(Publication en cours rédaction)

**Résumé**

L'objectif de cette étude était de montrer les propriétés antifongiques du système lactoperoxydase avec/sans l'iode (LPOSI/LPOS) incorporés dans trois concentrations de chitosane (0,5 ; 1 et 1,5%). Les films obtenus ont été testés sur deux souches fongiques (*Phomopsis sp.* et *Pestalotiopsis mangiferae*) que nous avons isolées des mangues 'Amelie' provenant de la Côte d'Ivoire.

Les résultats ont révélé que la souche *Pestalotiopsis mangiferae* était plus sensible à l'action des films contrairement à la souche *phomopsis sp.* La concentration de la solution de chitosane à 1% avec ou sans les systèmes enzymatiques était suffisant d'inhiber la souche *Pestalotiopsis mangiferae*.

La souche *Phomopsis sp.* était inhibée par les films contenant le LPOS surtout lorsque le LPOS était incorporé dans la solution de chitosane à 1 et 1,5%. Par contre la présence de l'iode dans la solution enzymatique diminuait l'action antifongique des films contre cette souche.

## V.1 Introduction

La Production de mangues est économiquement importante en Afrique de l'Ouest. Malheureusement, cette production est fortement handicapée par diverses maladies, y compris ceux qui se développent après la récolte. La pourriture pédonculaire ou Stem and rot est l'une des causes de la détérioration massive des fruits. Plusieurs champignons sont responsables de cette maladie ; *Lasiodiplodia theobromae* (*Botryodiplodia theobromae*), *Phomopsis mangiferae* et *Pestalotiopsis mangiferae* (Dodd et al, 1996)

La pourriture des mangues causée par les souches *phomopsis sp* se propage généralement de la tige du pédoncule et s'accroît au fur et à mesure que le fruit mûrit. Les lésions peuvent être similaires à celles causées par *C. gloeosporioides* de point de vue visuelle. Cependant elles peuvent pénétrer jusqu'à une profondeur de 10 à 20 mm contrairement à *C. gloeosporioides* (Johnson and Sangchote 1994).

Les pourritures causées par *Pestalotiopsis mangiferae* apparaissent en taches grises argentées qui varient en taille, et ont une bordure noirâtre. Ce pathogène s'attaque généralement à la plante lorsque celle-ci est vieillissante et mal entretenue. (Das et al, 2010).

La méthode la plus courante utilisée contre ces maladies est le traitement des fruits avec des fongicides synthétiques. Cependant, avec le développement de la résistance des souches fongiques à ces fongicides, cette stratégie perd son efficacité dans la conservation post-récolte des fruits. Une alternative contre ce problème de résistance de souches reste l'utilisation des biopréservateurs.

Le système lactoperoxydase (LPOS) est d'un intérêt dans la conservation des fruits parce que c'est un composé naturel bioactif présentant des propriétés antimicrobiennes (Losso et al, 2000; Naidu 2000; Shah 2000; Ducamp-Collin et al, 2006). Le LPOS est un système antimicrobien naturel dans les sécrétions de l'homme tels que la salive, les larmes et le lait (Kussendrager and Hooijdonk 2000). Les activités antimicrobiennes du LPOS contre diverses souches pathogènes ont été rapportées ; *Salmonella* et *E. coli* O157: H7 (Kennedy et al, 2000), *Colletotrichum sp* et le *Xanthomonas campestris* (Le Nguyen et al, 2005).

Le LPOS génère des produits oxydants tels que hypothiocyanite (OSCN<sup>-</sup>) et de l'acide hypothiocyanate (HOSCN), qui inhibent les micro-organismes par l'oxydation de groupement sulfhydryle (SH) des enzymes microbiennes et d'autres protéines.



Pour maintenir les molécules antimicrobiennes (OSCN<sup>-</sup> et HOSCN<sup>-</sup>) du système, le LPOS pourrait être incorporé dans une matrice à base de polymère.

Le chitosane dérivé de la carapace des crustacés est un produit d'origine biologique avec une charge cationique lorsqu'il est dissous dans un acide faible. Cette charge ionique cationique permet au chitosane en solution de réagir avec tous les composés biologiques à charge négative (comme les lipides ou des protéines). En plus le chitosane possède d'excellentes propriétés antifongiques (Atia et al, 2005; Rungsardthong et al, 2006) et antibactérien (Helander et al, 2001; Bin et al, 2008).

## **V.2 Matériels et Méthodes**

### **V.2.1 Isolement des souches de moisissures**

Les souches ont été isolées des parties infectées de trois mangues de la variété 'Amélie' de Côte d'Ivoire épluchées aseptiquement, à l'aide d'une anse stérile et cultivées sur milieu PDA incubé pendant 10 jours à 25°C. L'isolement a été suivi d'une purification des souches repiquées sur le milieu PDA additionné de chloramphénicol.

### **V.2.2 Protocole d'extraction**

La méthode d'extraction de Karakousis *et al*, (2006), reprise par El Sheikha *et al*, (2010) a été utilisée pour l'extraction de l'ADN des moisissures. Les souches pures isolées sur milieu PDA au chloramphénicol ont été prélevées et mises en suspension dans 2 mL d'eau peptonée stérile dans des tubes Eppendorff (duplica). Après ajout de billes de verre (0,3 g) de diamètre de 425 - 600 µm (Sigma, France), les tubes ont été vortexés (Genie 2 SI-A256, USA) 30 mn à vitesse maximum puis centrifugés à 12.000 g pendant 15 min. Le culot cellulaire est resuspendu dans 300 µL de tampon d'hydrolyse [2% Triton X-100 (Prolabo, France); 1% de SDS, 100 mM NaCl (Sigma, France), 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0 (Promega, France)] ; 100 µL de TE (10 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA (Promega, France), pH 8,0. 100 µL de solution de lysozyme (25 mg.mL<sup>-1</sup>, Eurobio, France) ,100 µL de solution de protéinase K (20 mg.mL<sup>-1</sup>, Eurobio, France) sont ajoutés et le mélange est incubé à 42°C pendant 20 min. 50 µL de SDS 20% sont ajoutés à chaque tube, puis les tubes sont incubés à 42°C pendant 10 min. 400 µL de MATAB (Sigma, France) sont ajoutés à chaque tube suivi d'une incubation à 65°C pendant 10 min puis agités au vortex pendant 5 min. 700 µL

de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v Carlo Erba, France) sont ajoutés deux fois et les tubes sont agités au vortex pendant 5 min, puis centrifugés à 12 000 g pendant 15 min. La phase aqueuse est transférée dans un flacon Eppendorff et le phénol résiduel est éliminé par extraction avec 600 µL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, Carlo Erba, France) et centrifugé pendant 15 min à 12 000 g. La phase aqueuse recueillie et l'ADN est stabilisé avec 30 µL d'acétate de sodium (3 M, pH 5), suivie d'une précipitation par ajout d'un volume égal d'isopropanol glacé et l'ADN dans l'isopropanol est conservé à -20°C pendant 12 h. Après centrifugation à 12 000 g pendant 15 min, le surnageant est éliminé, les culots d'ADN sont lavés avec 500 µL d'éthanol à 70%, et les tubes sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 min. L'éthanol est ensuite éliminé et les culots sont séchés à l'air à température ambiante pendant 60 min. Enfin, l'ADN est remis en suspension dans 50 µL d'eau ultra pure et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse.

#### **V.2.2.1 Vérification de l'extraction d'ADN sur gel d'agarose**

8 µL de la solution d'ADN extrait auxquels sont ajoutés 2 µL de la solution du colorant bleu/orange (Promega, France) sont déposés dans chaque puits du gel d'agarose à 0,8%. Le marqueur de taille moléculaire est un marqueur de 16,21 kb (Invitrogen, USA). La migration dure 45 min sous une tension de 100 V. Après la migration, le gel d'agarose est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (Promega, France) à 50 µg/mL pendant 15 min, puis rincé durant 10 min à l'eau avant d'être observé sur un trans-illuminateur UV  $\lambda=318$  nm. Le gel est photographié par une caméra numérique et la photo est traitée avec le logiciel Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France).

#### **V.2.2.2 Amplification des ADN extraits par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)**

##### **V.2.2.2.1 Amorces utilisées**

La région D1/D2 de l'ADNr 26/28S est amplifiée en utilisant le couple d'amorces, GC U1f et U2r. Le Primer U1 correspond aux coordonnées de 403 à 422, et l'amorce U2 correspond aux coordonnées de 645 à 662 d'un ADN 28S de référence de *S. cerevisiae* (J01355 numéro d'accèsion GenBank). Ces amorces produisent un amplicon de 260 pb (El Sheikha et al, 2010)

#### **V.2.2.2.2 Conditions de la PCR**

Une dénaturation initiale est réalisée à 95°C pendant 3 min, suivie d'une série répétée de 30 cycles incluant une étape de dénaturation à 94°C pendant 45 sec, suivie d'une hybridation à 50°C pendant 50 s et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 90 s. Puis l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 5 min.

#### **V.2.2.2.3 Vérification des produits PCR**

La taille attendue des produits PCR de 260 pb des amplicons a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose (Promega, France) à 2% (p/v) dans un tampon TAE 1X. Le protocole utilisé est le même que celui utilisé pour la vérification des extraits d'ADN mais en utilisant un marqueur de taille de 100 pb (Promega, France).

#### **V.2.2.3 Séquençage des fragments d'ADN du produit PCR et identification des souches**

Le produit de PCR a été purifié et séquencé par GATC Biotech (Allemagne). Les séquences des ADNr 28S obtenues ont été comparées à celles de la banque de données disponibles sur le site de GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) grâce au programme BLAST afin de déterminer les séquences connues les plus proches.

#### **V.2.3 Préparation de la solution de LPOS**

La solution enzymatique a été préparée en dissolvant 15,5 mg de LPO; 10,6 mg de GO; 3,36 g de Glu ; 32 mg de KSCN et 55 mg de KI, dans 50 mL de tampon phosphate à pH 6,2 (0,1 M). Deux solutions ont été préparées: l'une sans iode (LPOS) et l'autre avec iode (LPOSI). Les solutions sont incubées à 23,2°C pendant 18h dans un bain marie (Modèle G76, New Brunswick, Scientific, Edison NJ).

#### **V.2.4 Préparation de la solution filmogène**

La solution de chitosane est préparée par dissolution de flocons de chitosane dans de l'eau distillée contenant 0,7% d'acide lactique (v/v). Le pH de la solution est ajusté à 5,5 avec 0,46 M  $K_2HPO_4$  (sigma-Aldrich, Suisse). Les différentes concentrations de solutions préparées sont 0,5 ; 1 et 1,5% (p/v). Le glycérol (25% p/p de chitosane) est ensuite ajouté, et le mélange est homogénéisé sous agitation magnétique pendant 30 mn. La solution enzymatique est ajoutée au gel de chitosane pour avoir une

concentration de 5% (v/v) puis le mélange est à nouveau homogénéisé pendant 15 mn. Pour chaque concentration de solution de chitosane, trois solutions finales sont préparées à savoir la solution contenant le LPOS, la solution contenant le LPOSI et la solution de chitosane seule.

#### **V.2.5 Préparation des films enrichis au LPOS**

Les films sont préparés par addition de la solution enzymatique dans le gèle de chitosane. La concentration de LPOS dans la solution de chitosane est de 5% (v/v). Après 30 mn d'homogénéisation, 10g de la solution finale chitosane-système lactoperoxydase est versé dans une boîte de Pétri (9 cm de diamètre) et séché à  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  et  $75\% \pm 5$  HR pendant 24 h. Après séchage, les films sont exposés aux UV pendant 15 mn avant utilisation.

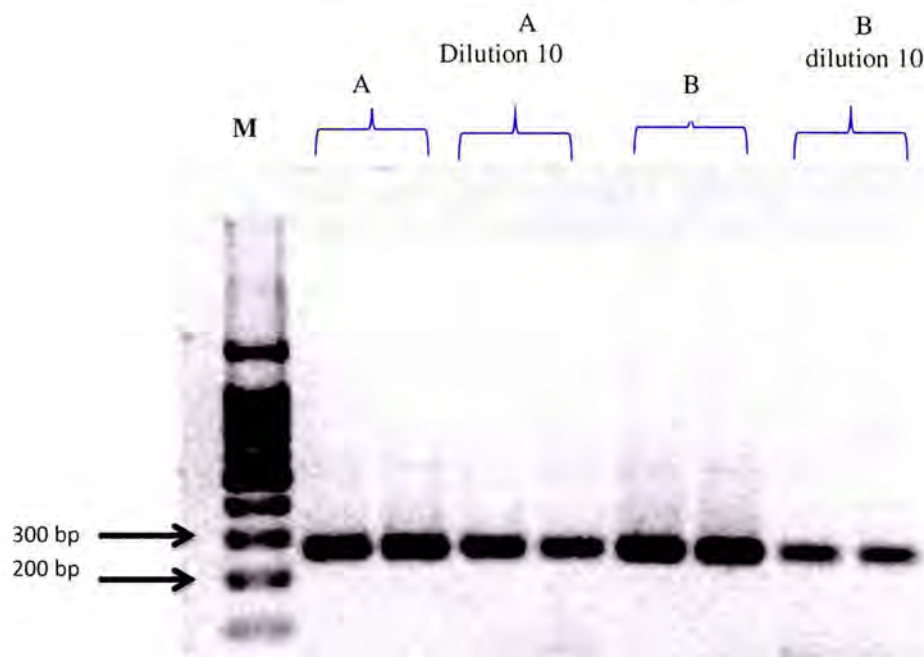
#### **V.2.6 Evaluation de l'activité antifongique in vitro du chitosane et le LPOS**

3  $\mu\text{L}$  d'une suspension de spores à  $10^5$  spores/mL sont déposés au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu PDA. Après la diffusion de la suspension dans la gélose, un disque de film de 12 mm de diamètre est déposé au même endroit que la suspension de spores. Les boîtes de Pétri sont placées à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 3 h avant d'être incubées à  $25^{\circ}\text{C}$ . Une boîte contrôle est réalisée dans les mêmes conditions mais sans film. Les diamètres des mycéliums sont mesurés manuellement. L'indice fongicide exprimé en % est calculé par la formule :  $\text{Indice de fongicide (\%)} = 1 - (D_s/D_c) \times 100$ , où  $d_s$  est le diamètre de la zone de croissance des boîtes avec film et  $d_c$  celui de la zone de croissance de la boîte contrôle.



## V.3 Résultats

### V.3.1 Isolement des souches de moisissures et identification des sources



**Figure 1 :** photo de l'électrophorèse en gel d'agarose des produits de la pCR obtenus avec l'ADN extrait des deux souches isolées A et B.

La photo du gel d'agarose (Fig 1) obtenue des souches pures de moisissures montre la bonne qualité et quantité des ADN de moisissure et qu'il n'y a aucune influence d'inhibiteur potentiel sur l'amplification. La position des différentes bandes observées correspond à celle de bande de 260 pb, soit la taille attendue de l'amplicon. Les amplicons ont été séquencés. Leur séquence a été comparée avec celles de souches de référence déposées sur la Databank internet (source Website NCBI), a permis de préciser la nature des souches en y adjoignant un score de similitude avec les souches déposées dans la Databank et la p-value du test. Les séquences des ADNr 28S obtenues sont comparées à celles de la banque de données disponibles sur le site de GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) grâce au programme BLAST afin de déterminer les séquences connues les plus proches. Les souches isolées sont identifiées comme appartenant respectivement aux espèces *Pestalotiopsis sp* et *Phomopsis sp. RP257* (Tableau1)

**Tableau 1** : Identification des souches

<i>Séquence</i>	<i>Nom de la souche</i>
(A)  GCTGGCCTTTACTGGGCAAAGT GCACCGGAGAGAACCCCGGAT GATCCGCCCAGAAAAAGTCT GGTCACAAATCCTTCCC TTTCAACAATTT	<i>Phomopsis sp. RP257</i>
(B)  GCTCCGTTCCCGACGGTC TTATCCCCCGCGAAAACC GATGCTGGCCTGTGCCGGGC GAGTGACAGGGGAGAACCC CTGATGAGCCGCCCCGGCCCAA GTCTGGTCATAAGTGCTTCCC TTTCAACAATTTTAC.	<i>Pestalotiopsis sp</i>

### V.3.2 Effet Antifongique

Les résultats de l'activité antifongique des trois types de films (Chitosane, Chitosane-LPOS et Chitosane-LPOSI) sont indiqués par la Figure 2.

Chaque test a été répété 3 fois et les données ont été analysées par le logiciel Statistica 7 avec la méthode de Scheffe à 5%.

L'influence du test antifongique des différents films testés sur la croissance des souches est différente. Le *pestalotiopsis sp* est très sensible au film. Si la concentration de 0,5% de chitosane seul a un effet d'inhibition faible, les concentrations de 1 et 1,5% inhibent totalement la croissance de la souche. La présence du LPOS avec ou sans l'iode n'influence pas significativement ( $p < 5\%$ ) l'efficacité des films à base de 1 et 1,5% de chitosane. Par contre, pour les systèmes enzymatiques (LPOS et LPOSI) fixés au chitosane de 0,5%, le pourcentage

d'inhibition passe de 26 à 93%.

Le *Phomopsis* RP 257 réagit de façons diverses en présence des films. Il est résistant au film de chitosane ne contenant pas le système enzymatique, néanmoins cette résistance diminue avec l'augmentation de la concentration du film. Lorsque les films de chitosane sont fixés avec le LPOS (Chit-LPOS), le pourcentage d'inhibition du *Phomopsis* RP 257 augmente significativement ( $p < 5\%$ ), surtout avec la concentration de chitosane de 1 et 1,5%. Par contre les films fixés avec le LPOSI (Chit-LPOSI) présentent un pourcentage d'inhibition très faible.

#### V.4 Discussion

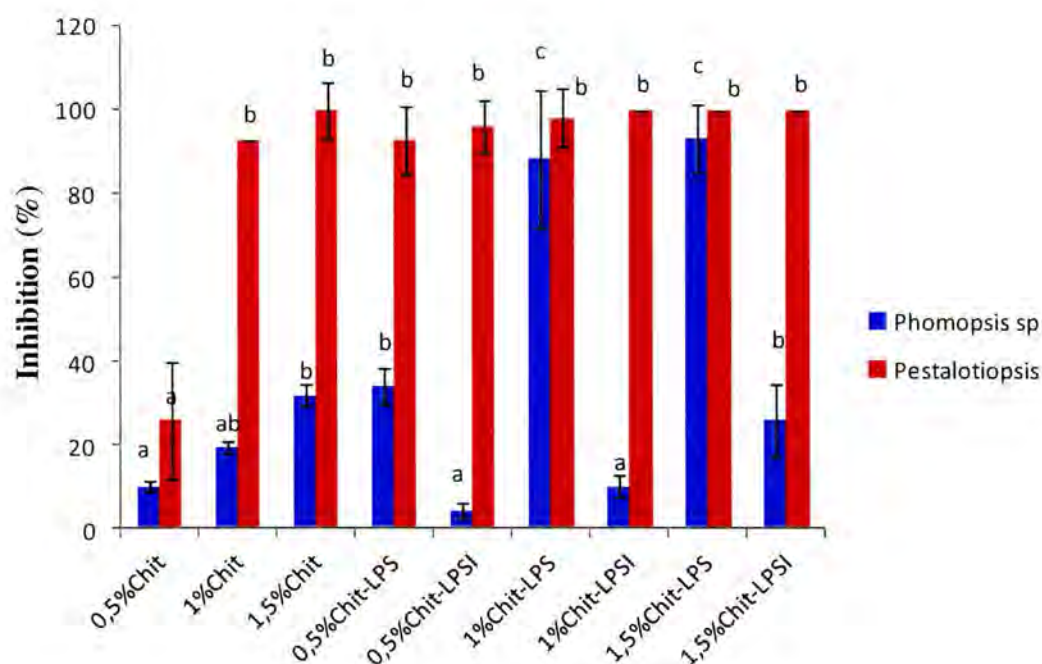
Plusieurs moisissures sont responsables de maladies post-récoltes des mangues. Si l'antracnose est la plus répandue, certaines espèces telles que *phomopsis* et *pestalotiopsis* ont été identifiées comme étant des agents responsables de cette altération post-récolte de la mangue (Ploetz et al, 1996; Kobiler et al, 2001; Ploetz 2003). Ces souches induisent des symptômes semblables regroupés sous le nom de pourritures pédonculaires ou stem-end rot.

Les résultats des tests antifongiques montrent que les deux souches étudiées *pestalotiopsis sp* et *Phomopsis* RP 257 sont, à des degrés différents, sensibles aux films de chitosane enrichis ou non par le système lactoperoxydase.

Le chitosane est actif contre *pestalotiopsis sp* dans les conditions in vitro testées à la concentration de 1 et 1,5%. Ce qui est en accord avec les résultats de différents auteurs (Bautista-Baños et al, 2003; Devlieghere et al, 2004). Concernant la souche de *phomopsis* RP 257. On observe une légère augmentation de l'inhibition en fonction, de la concentration en chitosane, cependant, elle est inférieure à celle mesurée par Zhang et al, (2003) qui ont montré que l'oligo-chitosane inhibait à 80% *Phomopsis asparagi*. Nos résultats s'accordent avec ceux de Król (2005), Nascimento et al, (2007) et Bautista-Baños et al, (2003) qui ont montré que le chitosane inhibait faiblement la croissance de *Phomopsis viticolas*.

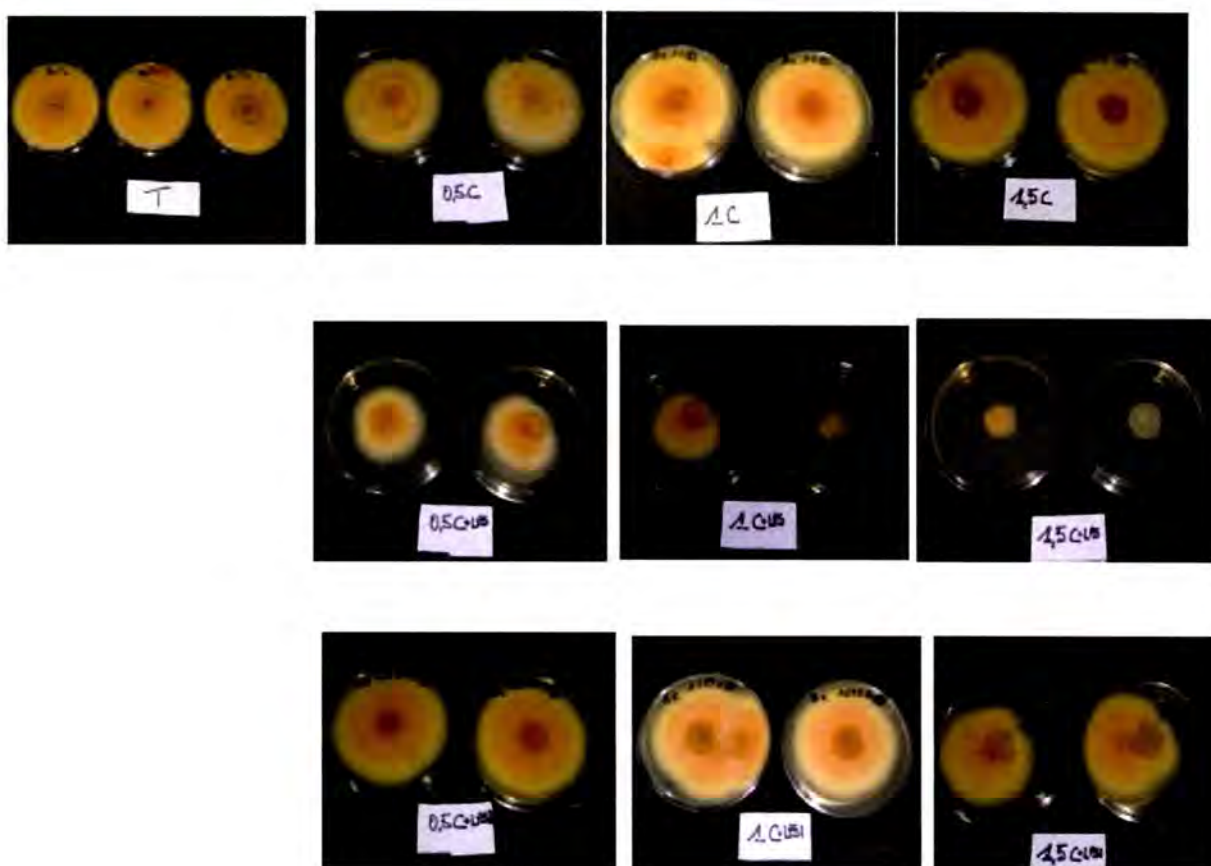
Si l'addition des systèmes enzymatiques (LPOS et LPOSI) au film de chitosane n'influence pas significativement l'activité antifongique vis-à-vis de la souche *Pestalotiopsis sp.*, elle réagit différemment contre le *Phomopsis sp.* ; on observe une augmentation de l'activité antifongique des films chitosane / LPOS contre la souche *phomopsis sp*. Cet effet augmente avec l'augmentation de la concentration de chitosane. Par contre, la présence d'iode au côté du LPOS diminue l'activité

antifongique du système contre le *Phomopsis sp* (Figure 2 et 3). La sensibilité des souches en présence du LPOS contenant ou non l'iode a été étudiée (Pruitt and Reiter, 1985; Sagoua, 2009). Bosch *et al.* (2000) ont démontré que la présence d'iode augmentait l'activité antibactérienne du LPOS contre le *Pseudomonas aeruginosa*, par contre sa présence diminuait l'activité du LPOS contre *E. coli* et *Staphylococcus aureus*. Quand à Min et Krochta, (2005), ils ont montré que le LPOSI fixé dans un à un film comestible à base de protéine de lactosérum était efficace contre la croissance de *Penicillium commune* contrairement à un film contenant le LPOS sans l'iode.



**Figure 2 :** Activité antifongique du chitosane avec LPOS contre des souches pathogènes de la mangue





**Figure 3:** Photographies de tests in vitro en boîte de Pétri de l'Effet antifongique de couplage Chitosane-LPOS contre la souche de *Phomopsis sp.*

## V.5 Conclusion

Ces résultats suggèrent qu'un film de chitosane ayant fixé ou non le LPOS pourrait être utilisé pour enrober des mangues et lutter efficacement contre la pourriture pédonculaire causée par des souches de *Phomopsis* et de *Pestalotiopsis*.

Ces résultats représentent une alternative possible pour réduire le recours à des molécules de synthèse chimiques pour le contrôle des maladies post-récolte des fruits.

**CHAPITRE VI**  
**EFFET DU COUPLAGE CHITOSANE-LPOS SUR LA QUALITE DE LA**  
**CONSERVATION POST RECOLTE DES MANGUES**

## **Effet du couplage Chitosane-LPOS sur la qualité de la conservation post-récolte des mangues**

(Publication en cours de rédaction)

### **Résumé**

L'influence des enrobages de chitosane avec ou sans les systèmes enzymatiques a été étudiée sur la conservation post-récolte des mangues. Les mangues ont été traitées avec trois concentrations de chitosane (0,5 ; 1 et 1,5%) contenant ou non les systèmes enzymatiques. Les enrobages à base de 1% de chitosane contenant le LPOS ou le LPOSI ont permis d'inhiber la prolifération microbienne et retarder le mûrissement des fruits sans provoquer des désordres physiologiques. La présence de l'iode n'a pas influencé significativement l'activité antifongique du LPOS. Les paramètres de mûrissement (fermeté, intensité respiratoire, la perte de poids, la couleur etc) n'ont pas été influencés par le LPOS et le LPOSI

## VI.1 Introduction

Chaque année, les pays en développement enregistrent d'énormes pertes post-récolte des fruits et légumes. On estime que 25 à 80% de la production pourraient être perdus en raison de la détérioration (Baldwin 1994). Parmi ces produits agricoles, la mangue occupe une place importante car c'est le deuxième fruit tropical le plus produit dans le monde après la banane (FAO 1999). Cependant, elle rencontre d'énorme problème de conservation en raison de diverses maladies causées par des champignons et des bactéries. Le contrôle de ces maladies est devenu de plus en plus difficile. L'émergence de souches résistantes aux fongicides et la réglementation de plus en plus rigoureuse sur l'utilisation de fongicide ont réduit la possibilité de concevoir des stratégies de contrôle basées sur les produits chimiques (Johnson and Sangchote 1994). Une alternative à ces problèmes est l'utilisation de molécules naturelles possédant un large spectre antimicrobien.

Le système lactoperoxydase (LPOS) présente d'excellentes qualités dans la lutte contre les microorganismes pathogènes car elle possède un large spectre antimicrobien. Ce système enzymatique a montré un effet bactéricide sur les bactéries à Gram négatif et un effet bactériostatique sur les bactéries Gram positif (Seacheol et al, 2005). En outre, il a une activité antifongique (Jacob et al, 2000) et antivirale (Pakkanen and Aalto 1997; Seifu et al, 2005). Ce système génère des produits antimicrobiens intermédiaires tels que l'hypothiocyante (OSCN<sup>-</sup>) et l'acide hypothiocyante (HOSCN). Ces produits hautement réactifs inhibent les microorganismes par l'oxydation des groupements sulfhydryles (Martínez-Camacho et al, 2010). La présence de l'iode au côté du thiocyanate pourrait augmenter l'effet fongicide et bactéricide contre les microbes tels que *Candida albicans*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Bosch et al, 2000). L'incorporation de LPOS dans une matrice de polymère par immobilisation, l'absorption, ou de piégeage a été exploitée dans les domaines pharmaceutiques et alimentaires. L'efficacité du LPOS incorporé dans les protéines de lactosérum (Min et al, 2005; Min and Krochta 2005) et dans les films d'alginate (Fatih et al, 2009) a été démontrée. Le but de l'incorporation des antimicrobiens dans l'enrobage est d'empêcher la croissance des pathogènes à la surface des aliments où une grande partie de la détérioration et la contamination se produit (Appendini and Hotchkiss 2002).



Le chitosane possède des propriétés chimiques et biologiques multiples. Dans sa chaîne polyglucosamine linéaire, il possède des groupes amino et hydroxyle réactifs se prêtant à des modifications chimiques. Dissout dans une solution acide, le chitosane possède une haute charge positive sur les groupements  $-NH^{3+}$  qui peuvent former un agrégat avec des polyanions. Cette caractéristique confère au gel de chitosane d'excellentes propriétés notamment une remarquable affinité aux protéines. En outre, le chitosane possède des propriétés antimicrobiennes capables de protéger les fruits contre la détérioration fongique. Le chitosane pourrait fixer le LPOS pour maintenir son activité antimicrobienne aussi longtemps que possible, il peut également retarder le murissement des fruits.

L'objectif de cette étude, est d'étudier l'interaction entre la concentration de chitosane et l'efficacité du LPOS dans la conservation post-récolte des mangues.

## **VI.2 Matériels et Méthodes**

### **VI.2.1 Matériels**

#### **VI.2.1.1 Végétal**

Les mangues 'Kent' (*Mangifera indica* L.), importées du Brésil, ont été achetées dans un supermarché local. Les fruits de taille uniforme ( $591 \pm 30$  g) et de stade de maturité identique (basé sur la couleur interne et la fermeté) et indemnes de blessures visibles ont été sélectionnés.

#### **VI.2.1.2 Biochimique**

Le système enzymatique est composé de la Lactoperoxydase (LPO ; 140 U/mg), de la glucose oxydase (GO, 158,9 U/mg), du thyocyanate de potassium (KSCN), du glucose (Glu) et de l'iodure de potassium (KI). LPO et KSCN proviennent de la société Bioserae, la GO et le Glu, de Sigma-Aldrich (St louis, MO), et KI provient de Fluka analytical. Le chitosane (> 90% DDA, viscosité [500-2000 cps] a été fourni par France chitine (Marseille).

### VI.2.1.3 Microbiologique

Les souches bactériennes utilisées lors de cette étude sont présentées dans le tableau I

**Tableau 1** : Différentes souches pathogènes de la mangue

Souches	codes	Hôte	Condition de culture	Origine
<i>Xanthomonas campestris</i> , pv. <i>Mangiferae indicae</i> (CFBP INRA, France)	2929	Mangue	28°C	Taiwan
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	C64	Banane	25°C	Cameroun
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	C4612	Banane	25°C	Guadeloupe
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	C62	Banane	25°C	Cameroun
<i>Lasiodiplodia theobroma</i>	Ngr 05A	Cacao	25°C	
<i>Phomopsis</i> sp. RP257	RP257	Mangue	25°C	Cote d'ivoire
<i>Pestalotiopsis</i> sp		Mangue	25°C	Cote d'ivoire

### VI.2.2 Préparation de la solution de LPOS

La solution enzymatique a été préparée en dissolvant 15,5 mg de LPO; 10,6 mg de GO; 3,36 g de Glu ; 32 mg de KSCN et 55 mg de KI, dans 50 mL de tampon phosphate à pH 6,2 (0,1 M). Deux solutions ont été préparées: l'une sans iode (LPOS) et l'autre avec iode (LPOSI). Les solutions sont incubées à 23,2°C pendant 18h dans un bain marie (Modèle G76, New Brunswick, Scientific, Edison NJ).

### VI.2.3 Préparation de la solution filmogène

La solution de chitosane est préparée par dissolution de flocons de chitosane dans de l'eau distillée contenant 0,7% d'acide lactique (v/v). Le pH de la solution est ajusté à 5,5 avec 0,46 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (sigma-Aldrich, Suisse). Les différentes concentrations de

solutions préparées sont 0,5 ; 1 et 1,5% (p/v). Le glycérol (25% p/p de chitosane) est ensuite ajouté, et le mélange est homogénéisé sous agitation magnétique pendant 30 mn. La solution enzymatique est ajoutée au gel de chitosane pour avoir une concentration de 5% (v/v) puis le mélange est à nouveau homogénéisé pendant 15 mn. Pour chaque concentration de solution de chitosane, trois solutions finales sont préparées à savoir la solution contenant le LPOS, la solution contenant le LPOSI et la solution de chitosane seule.

#### VI.2.4 Tests antimicrobiens

Après décontamination à l'hypochlorite de sodium (1%), 9 lésions de 1 mm de diamètre et 3 mm de profondeur sont pratiquées sur les deux côté opposés de la mangue à l'aide d'un système formé de clous fixés sur une planche permettant ainsi d'avoir des blessures de distance et de profondeur identiques. La distance entre deux lésions consécutives est de 20 mm.

Les fruits sont ensuite inoculés individuellement par immersion pendant 1 mn dans la solution microbienne ( $10^5$  spore/mL de moisissure et  $10^6$  CFU/mL de *X. campestris*). Après inoculation, ils sont laissés à la température ambiante du laboratoire pendant une nuit avant d'être immergés dans l'enrobage de chitosane, puis stockés à 18°C et 60% HR.

#### VI.2.5 Mesure de la respiration des fruits

L'intensité respiratoire est déterminée de manière statique en plaçant individuellement les mangues dans une enceinte hermétiquement close et équipée d'un septum pendant 3h. Trois prélèvement d'échantillons de 0,5 ml d'air sont effectués avec des seringues hypodermiques étanches au gaz et analysés pour déterminer le % de CO<sub>2</sub> et

O<sub>2</sub> par chromatographie en phase gazeuse.

L'intensité respiratoire est exprimée en mmol.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> dans les conditions normales de température et de pression.

$$\frac{(\% O2\ initial - \% O2\ final) \times (V_{conteneur} - V_{fruit}) \times 273 \times 1000}{100 \times (273 + \varphi) \times 22.4 \times t \times M}$$

$$\frac{(\% CO2\ final - \% CO2\ initial) \times (V_{conteneur} - V_{fruit}) \times 273 \times 1000}{100 \times (273 + \varphi) \times 22.4 \times t \times M}$$

% O<sub>2</sub> initial = concentration initiale en oxygène (%)

% O<sub>2</sub> final = concentration finale en oxygène (%) (0,01 % = 100 ppm)

% CO<sub>2</sub> initial = concentration initiale en gaz carbonique (%)

% CO<sub>2</sub> final = concentration finale en gaz carbonique (%)

V<sub>conteneur</sub> = volume du contenant ou récipient (cm<sup>3</sup>)

V<sub>fruit</sub> = volume des fruits (cm<sup>3</sup>)

P<sub>fruit</sub> = poids des fruits (kg)

t = temps (heure)

φ = la température (° C)

M = masse du fruit (Kg)

## **VI.2.6 Evaluation de la qualité des mangues**

### **VI.2.6.1 Perte de poids**

La perte de poids est déterminée par une pesée quotidienne des mangues à l'aide d'une balance (Precisa, Suisse). Elle est exprimée en pourcentage de poids initial.

### **VI.2.6.2 Fermeté**

La fermeté de la mangue est déterminée à l'aide d'un analyseur de texture TA XT2 (Instron Co., USA) relié au logiciel Texture Expert.

On mesure la force requise pour qu'un embout cylindrique de 2 mm de diamètre, monté sur un pénétromètre à support équipé d'un indicateur de force électronique Salter de 5 kg, pénètre dans la mangue. La valeur enregistrée est la force maximale requise pour que la pulpe cède à l'embout. La vitesse et le déplacement à la rupture du texturomètre sont respectivement 1mm/s et 3 mm.

### **VI.2.6.3 Mesure de la couleur de la peau des fruits**

La couleur de la peau des fruits est mesurée à l'aide d'un chromatomètre Minolta (Chroma meter CR 400, Japon) ayant une tête de mesure de 8 cm. Pour mesurer les couleurs, la tête de mesure est placée sur la surface du fruit, 3 mesures sont prises sur chaque face du fruit. La moyenne représente la valeur de la couleur. Les résultats sont déterminés dans l'espace de couleur L\*, a\* et b\*. L'étalonnage est réalisé avec une plaque blanche standard (L : 97,67 ; a : -0.54 ; b : 2.18). La coordonnée L\* mesure l'intensité lumineuse (blanc-noir et va de l'absence de réflexion L = 0, à la réflexion diffuse parfaite L = 100), l'échelle a\* va de valeurs négatives pour le vert à des



valeurs positives pour le rouge, tandis que l'échelle  $b^*$  va de valeurs négatives pour le bleu à des valeurs positives pour le jaune.

#### **VI.2.6.4 Extrait sec soluble**

Les mangues contiennent un grand nombre de composés solubles dans l'eau : sucres, acides, vitamine C, acides aminés et pectines. Ces composés constituent l'extrait sec soluble du fruit. Dans la plupart des fruits mûrs, y compris les mangues, les sucres en sont le principal élément. Le taux d'extrait sec soluble (ESS) ou de sucre est un indice de maturité ou de stade de murissement. Il est déterminé à l'aide d'un refractomètre portable.

#### **VI.2.6.5 pH, Acidité**

30 g de pulpe de mangue avec 150 ml d'eau distillée sont broyés dans un mixeur pendant 2 minutes, puis filtrés. Le pH est déterminé avec un pHmètre (Jennay, USA). L'acidité titrable est mesurée sur un échantillon de 10 ml. Le dosage est réalisé par titrage à la soude 0,1 N avec une burette en verre de 25 ml, afin d'amener le pH à 8,1 (virage de la phénol phtaléine).

Les résultats sont exprimés (en meq/100g d'échantillon) en terme d'acide prédominant. Dans le cas de la mangue, il s'agit de l'acide citrique (Norme français NF V 05-101).

### VI.3 Résultats et Discussion

Les données ont été analysées avec Statistica 7 et les moyennes comparées par le test de Student à un niveau de significativité de 5 %. Chaque essai a été repiqué au 3 fois.

#### VI.3.1 L'activité antimicrobienne de l'enrobage chitosane-LPOS

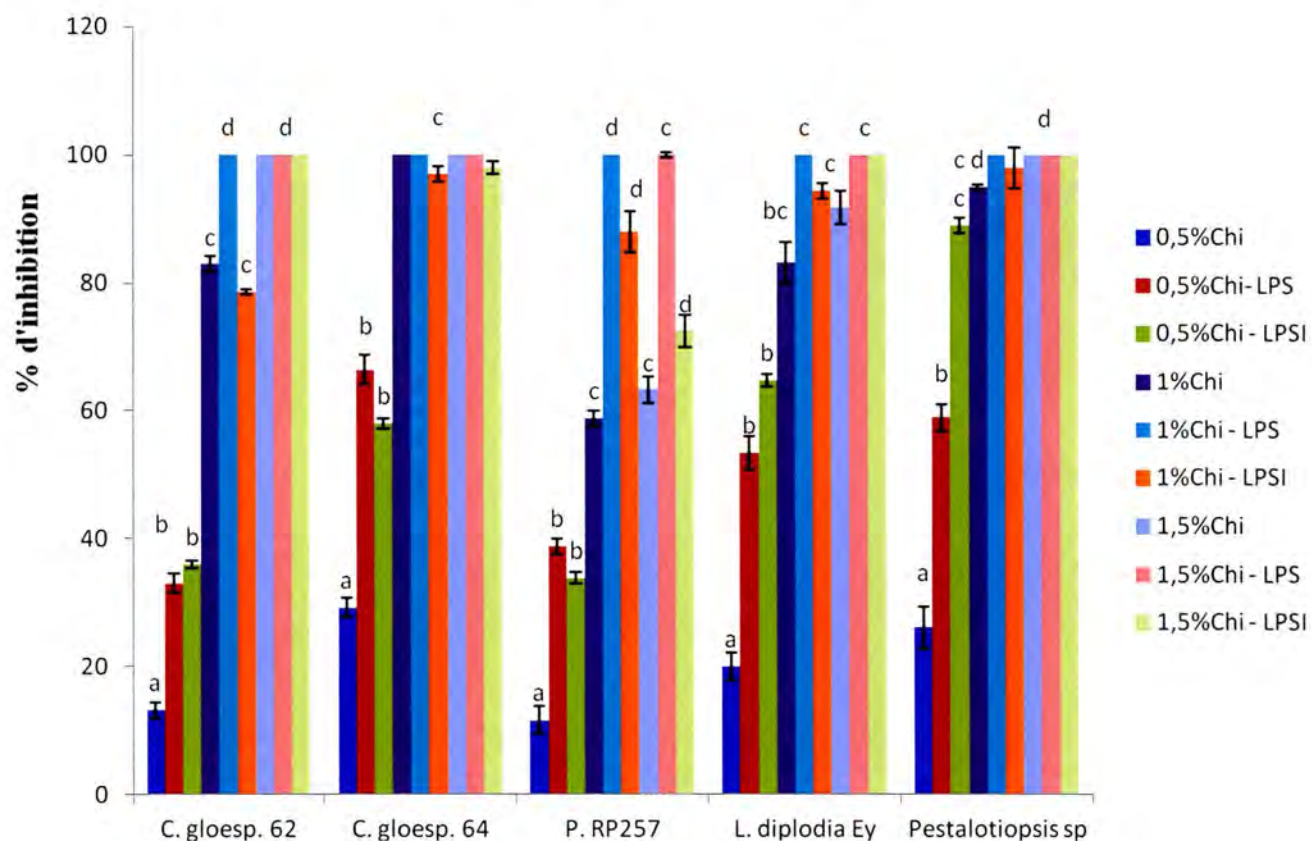


Figure 1: l'effet antifongique des différents traitements contre des souches pathogènes de la mangue

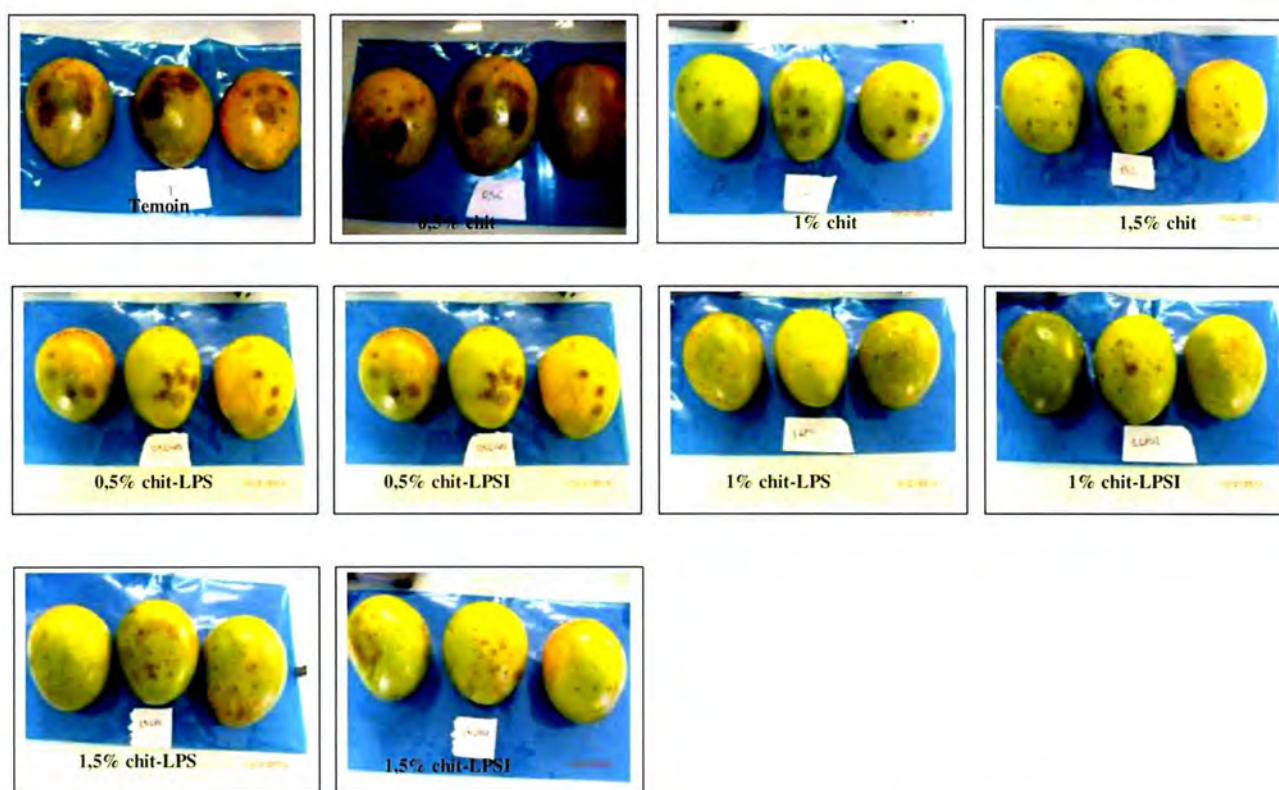


Figure 2: l'influence du chitosane-LPOS dans la conservation post-récolte des mangues

L'activité antimicrobienne du LPOS et LPOSI combinée à des concentrations d'enrobage de 0,5%, 1% et 1,5% de chitosane contre des souches pathogènes de la mangue a été déterminée. Après au moins une semaine de conservation à 19°C et une HR de 70%, le pourcentage d'inhibition des enrobages est calculé à partir du témoin, lorsque le diamètre des lésions de ce dernier dépasse 1 cm. Les inhibitions des souches *C. gloeosporioides* C4612 et *X. campestris* n'ont pas été déterminées car aucune lésion n'a été observée sur les mangues qu'elles soient enrobées ou pas. Les inhibitions des souches *C. gloeosporioides* 62, *C. gloeosporioides* 64, *L. diplodia* Ngr 05 et de *Pestalotiopsis* ont été calculées après deux semaines de conservation. Quant à *Phomopsis* RP257, le pourcentage d'inhibition a été déterminé après une semaine. Ce constat montre que *Phomopsis* RP257 est très virulent par rapport aux autres souches testées. L'analyse des figures 1 et 2 montre la sensibilité de chaque souche fongique aux différents enrobages appliqués.

L'activité antifongique des différents enrobages des souches croît avec l'augmentation de la concentration de chitosane. Elle augmente également en présence du système enzymatique. Lorsque la concentration de chitosane croît de 0,5% à 1%, le pourcentage d'inhibition des souches augmente brusquement. Par exemple, l'inhibition de *C. gloeosporioides* 62 passe de 13 à 83%. L'action inhibitrice du chitosane a été démontrée dans plusieurs études. Zhu *et al*, (2008) ont rapporté que l'effet antifongique du chitosane contre des souches de *C. gloeosporioides* était associé à sa concentration. Le fait que les effets bénéfiques du chitosane sur les mangues soient améliorés avec l'augmentation de la concentration de chitosane a également été observé dans d'autres études (El Ghaouth *et al*, 1992; Jiang and Li 2001; Liu *et al*, 2007).

En présence du système enzymatique, le pourcentage d'inhibition des souches est encore amélioré. Les souches qui opposaient une résistance au chitosane, voient leurs sensibilités augmenter. L'inhibition du *Phomopsis* qui était de 58 % en présence de 1% de chitosane seul, passe à environ 100% lorsqu'on combine le système enzymatique au chitosane (1%). Ces différents résultats montrent qu'il existe un effet synergique du couplage chitosane-LPOS. Cet effet inhibiteur est d'autant plus important quand l'incorporation du LPOS est réalisée avec une concentration de chitosane de 1 ou 1,5%. Quand on compare les effets d'inhibition des systèmes enzymatiques (LPOS et LPOSI) incorporés à la même concentration de chitosane, on remarque qu'il n'y a pas différence significative.

L'action inhibitrice du LPOS a été démontrée par d'autres auteurs. Sagoua (2009) a mis en évidence l'effet antifongique du LPOS seul ou combiné à de l'huile de Neem contre des souches pathogènes de la banane. Min et Krochta (2005) ont montré que le LPOSI incorporé à



un film comestible à base de protéine de lactosérum était efficace contre la croissance de *Penicillium commune* contrairement au film contenant le LPOS sans l'iode.

### VI.3.2 L'intensité respiratoire

La consommation en O<sub>2</sub> et le rejet de CO<sub>2</sub> des différentes mangues sont présentés dans le tableau 2. L'intensité respiratoire (IR) en CO<sub>2</sub> est largement supérieure à l'intensité respiratoire en O<sub>2</sub> des différentes mangues.

**Tableau 2** : Intensité respiratoire des mangues aux cours du temps

	2 jours		4 jours		6 jours	
	IR		IR		IR	
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
Temoin	0,19±0,04 <sup>a</sup>	0,41±0,06 <sup>a</sup>	0,18±0,03 <sup>a</sup>	0,37±0,03 <sup>a</sup>	0,12±0,02 <sup>a</sup>	0,44±0,09 <sup>a</sup>
1%chit	0,15±0,02 <sup>ab</sup>	0,48±0,05 <sup>ab</sup>	0,11±0,03 <sup>ab</sup>	0,49±0,12 <sup>b</sup>	0,07±0,01 <sup>b</sup>	0,65±0,21 <sup>b</sup>
1%chit-LPS	0,10±0,03 <sup>b</sup>	0,52±0,06 <sup>b</sup>	0,08±0,02 <sup>b</sup>	0,50±0,06 <sup>b</sup>	0,07±0,01 <sup>b</sup>	0,64±0,34 <sup>b</sup>
1,5%chit-LPS	0,09±0,01 <sup>b</sup>	0,43±0,06 <sup>a</sup>	0,07±0,01 <sup>b</sup>	0,51±0,09 <sup>b</sup>	0,05±0,00 <sup>b</sup>	0,47±0,04 <sup>ab</sup>
1%chit-LPSI	0,07±0,00 <sup>b</sup>	0,53±0,02 <sup>b</sup>	0,08±0,00 <sup>b</sup>	0,47±0,06 <sup>b</sup>	0,04±0,00 <sup>b</sup>	0,47±0,07 <sup>ab</sup>
1,5%chit-LPSI	0,08±0,03 <sup>b</sup>	0,44±0,05 <sup>a</sup>	0,09±0,03 <sup>b</sup>	0,42±0,09 <sup>b</sup>	0,08±0,01 <sup>b</sup>	0,48±0,16 <sup>ab</sup>
1,5%chit	0,12±0,04 <sup>ab</sup>	0,45±0,09 <sup>ab</sup>	0,09±0,02 <sup>b</sup>	0,49±0,11 <sup>b</sup>	0,05±0,01 <sup>b</sup>	0,58±0,19 <sup>ab</sup>

#### VI.3.2.1 Consommation d'oxygène des fruits

L'application de chitosane sur les mangues affecte la diffusion des gaz respiratoires.

Durant la conservation, on observe une réduction de la consommation en O<sub>2</sub> des différentes mangues.

Les mangues traitées au chitosane présentent des valeurs qui sont significativement inférieures aux valeurs des témoins ( $p < 0.05$ ). Par contre, il n'y a pas de différence significative entre les fruits traités avec une concentration de 1% de chitosane et les fruits



traités avec une concentration de 1,5% chitosane. La présence du système enzymatique (LPOS ou LPSI) n'a aucun effet sur la consommation en O<sub>2</sub>. Ces résultats montrent que l'enrobage à base de chitosane permet de limiter la consommation des fruits en O<sub>2</sub> au cours de la conservation. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans la première partie de notre étude, où nous avons démontré que la diffusion de O<sub>2</sub> pouvait être réduite par un film à base de chitosane, mais que l'adjonction du LPOS ne modifiait pas la perméabilité du film. D'autres travaux ont également mis en évidence la réduction de la perméabilité de l'oxygène d'un fruit par un enrobage à base de chitosane. Thumula (2006) a démontré que le chitosane pouvait réduire la consommation d'oxygène des tomates.

#### **VI.3.2.2 La production de CO<sub>2</sub>**

La production de CO<sub>2</sub> des fruits est également influencée par l'enrobage de chitosane. Après deux jours de conservation, il n'y a pas de différence significative entre les mangues enrobées et non enrobées. La production de CO<sub>2</sub> des mangues enrobées augmente rapidement au sixième jour. La hausse de la production de CO<sub>2</sub> dans les fruits enrobés pourrait être une réponse stressante due au traitement (El-Ghaouth et *al*, 1992). La forte production de CO<sub>2</sub> provoquée par l'enrobage de chitosane a été démontrée par des auteurs (El Ghaouth et *al*, 1992; Thumula 2006). Il n'y a pas de différence significative dans la production CO<sub>2</sub> des différentes mangues traitées aux différentes concentrations de chitosane (1% et 1,5%) combinées ou non à la LPOS ou LPSI.

Ces différents comportements de l'enrobage de chitosane vis-à-vis de la consommation en O<sub>2</sub> et de la production de CO<sub>2</sub> des différentes mangues, montrent que l'enrobage de chitosane réduit la respiration des fruits. Les enrobages comestibles conduisent à l'augmentation de CO<sub>2</sub> et une réduction de la concentration de O<sub>2</sub> dans les fruits enrobés, en abaissant les taux de respiration et l'indice de la détérioration. Ce qui contribue à prolonger la durée de vie des fruits (Hagenmaier 2005). Des niveaux élevés de CO<sub>2</sub> dans les fruits restreignent l'activité déshydrogénase succinique et d'induisent l'accumulation de l'acide succinique, qui conduit finalement à l'inhibition du cycle de Krebs (Deng et *al*, 2006). En outre, les faibles niveaux d'oxygène suppriment l'activité de la cytochrome oxydase et jouent un rôle dans l'inhibition de l'activité des oxydases comme l'acide ascorbique oxydase, la polyphénol oxydase, et l'oxydase d'acide glycolique (Özden and Bayindirli 2002). De toute évidence les enrobages comestibles contribuent à la réduction des activités vitales, afin de maintenir la qualité des fruits au cours du stockage.

Thumula (2006) a montré qu'un enrobage à base de chitosane à une concentration de 1% ou 2% pouvait retarder la maturation des tomates. (Jiang and Li 2001).

### **VI.3.3 La perte de poids des fruits au cours de la conservation**

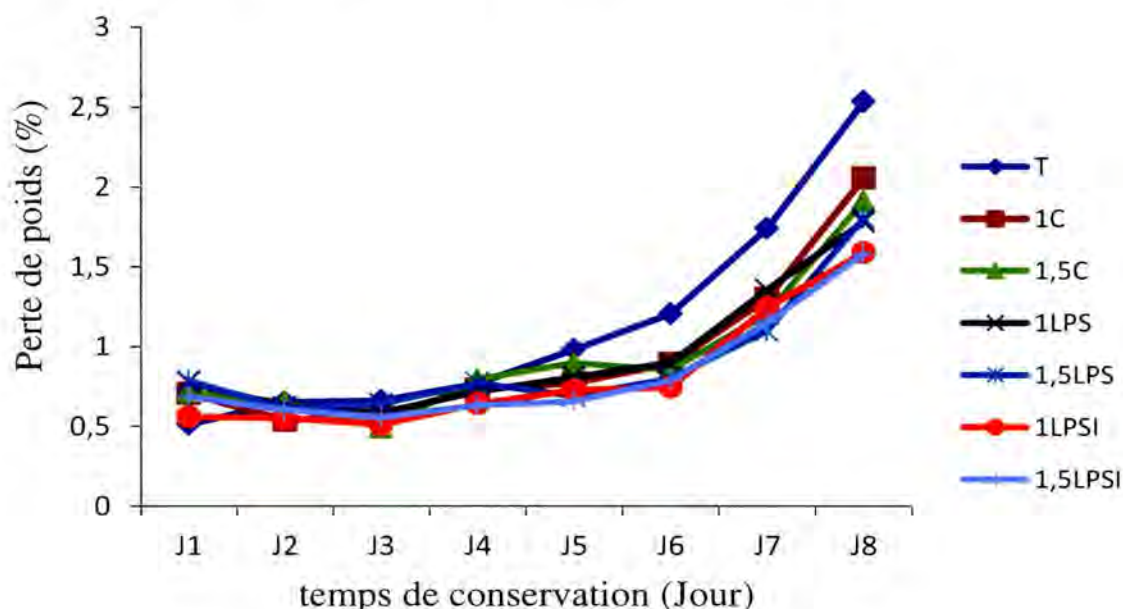
La plupart des cellules végétales contiennent des quantités très importantes d'eau. La cueillette provoque la suppression de l'apport d'eau par les racines, tandis que la transpiration ne s'arrête pas. D'une part, ce phénomène conduit à une diminution du poids due à la perte en eau par transpiration, et d'autre part, à une modification du métabolisme cellulaire à cause du stress hydrique (Ben-Yehoshua 1987).

La perte de poids est très déterminante dans la durée de conservation et la qualité des mangues comme pour les autres fruits. La Figure 3 montre l'influence de l'enrobage sur la perte de poids des mangues. La perte de poids des fruits augmente avec le temps de conservation quel que soit le traitement.

Au cours des cinq premiers jours de la conservation, il n'y a pas de différence significative entre les mangues enrobées et le témoin (mangue non enrobée). Mais après cinq jours, la perte de poids est plus élevée pour les témoins par rapport aux mangues enrobées. Au sixième jour, la perte de poids du témoin est de 1,2 % tandis que celles des fruits enrobés se situent autour de 0,8%. Ces résultats mettent en évidence une action protectrice du système d'enrobage contre la perte d'eau des fruits. Cette action protectrice a été indiquée par plusieurs auteurs (Vásconez *et al*, 2009; Ali *et al*, 2011). Le ralentissement de la perte en eau des fruits enrobés au chitosane peut être attribué à la barrière supplémentaire contre la diffusion à travers les stomates (Paull *et al*, 1989). Dans les fruits, la principale voie de la perte d'eau se fait à travers la peau. L'enrobage des mangues en couvrant la cuticule peut obstruer les stomates réduisant ainsi la perte d'eau.

Il n'y a pas de différence significative entre les pertes de poids des mangues traitées avec une concentration de 1% de chitosane et celles traitées avec une concentration de 1,5% de chitosane. De même, les valeurs des différents traitements avec la concentration de 1% de chitosane (1% Chit, 1% Chit-LPS, 1% Chit-LPSI) ne sont pas significativement différentes ( $p < 0,05$ ). La même remarque est observée entre les mangues traitées avec la concentration de 1,5% de chitosane. La présence du système enzymatique avec ou sans iode n'a pas d'influence sur le changement des pertes des poids des fruits. Ces résultats sont en conformité avec les résultats obtenus lors de l'étude de la perméabilité à la vapeur d'eau des films de chitosane avec ou sans la LPOS. Lors de cette étude, nous avons montré que la LPOS n'affectait pas la perméabilité à la vapeur d'eau des films de chitosane. Thumula (2006) qui a

étudié l'effet de l'enrobage du chitosane-lysozyme sur la qualité de la conservation des tomates, a montré de son côté que la présence du lysozyme n'influencait pas la perte de poids des tomates. Par contre l'incorporation des huiles essentielles dans la matrice d'enrobage de chitosane pourrait diminuer la perte en eau des produits enrobés en raison de son caractère hydrophobique (Min *et al*, 2007; Sánchez-González *et al*, 2011).



**Figure 9:** la perte de poids des mangues au cours de la conservation des mangues

#### VI.3.4 L'évolution de la couleur

La coloration de la peau des mangues est un critère de sélection importante. Elle peut donner une indication sur l'état de murissement des fruits.

Les résultats sont indiqués sur la figure 4. Une valeur de  $a^*$  positive correspond à la couleur rouge, alors qu'une valeur négative de  $a^*$  correspond à la couleur verte. L'échelle  $b^*$  va de la couleur bleu à la couleur jaune. Ces valeurs augmentent d'une manière générale au cours de la maturation des fruits.

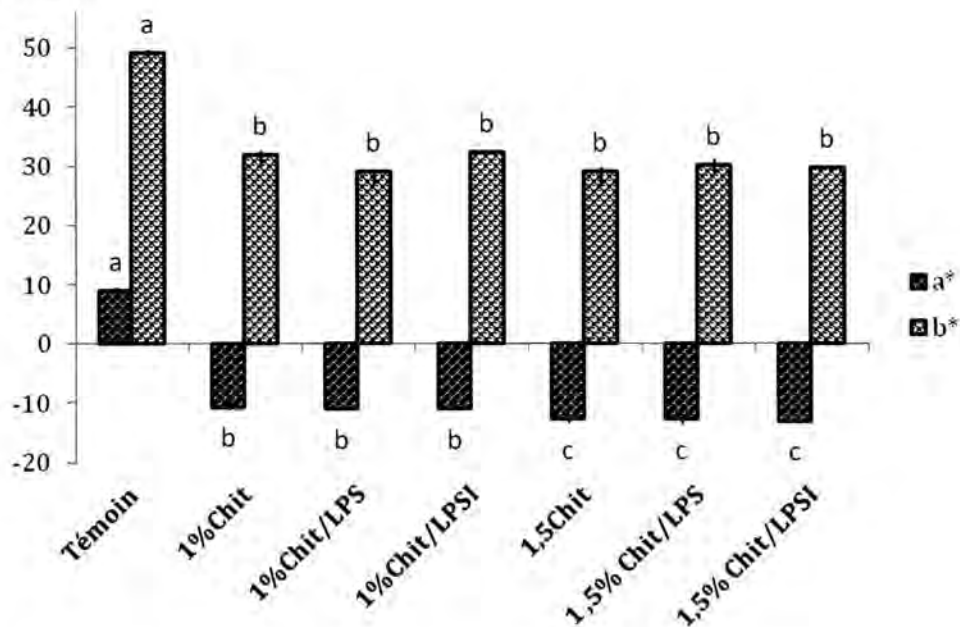
Dans nos essais, les témoins ont perdu leur couleur verte ( $a^* > 0$ ) contrairement aux fruits enrobés ( $a^* < 0$ ). Dans certains cultivars de mangues (Kent, Keitt ou Amélie), le passage de la coloration verte au jaune ou au rouge traduit le murissement du fruit. Ce passage se fait progressivement avec une dégradation des chlorophylles responsable de la couleur verte, entraînant un démasquage des caroténoïdes (couleur jaune) ou des anthocyanes (couleur rouge). Cela est confirmé par la valeur de  $b^*$  très élevée du témoin par rapport aux fruits enrobés. L'enrobage des mangues par le chitosane retarde le déverdissement des mangues. Ce



phénomène est dû à l'atmosphère créée sous le film. En effet, l'éthylène lorsqu'il se fixe sur les récepteurs membranaires déclenche l'activité ARNm responsable de la synthèse d'enzymes dont la chlorophyllase, dans le ribosome. Les teneurs en CO<sub>2</sub> étant élevées, celui-ci agit comme un inhibiteur de l'action de l'éthylène (Burg and Burg 1962) empêchant une synthèse suffisante d'enzymes pour le déverdissement. Les mangues conservent donc une coloration verte. Xing et al, (2001) ont démontré qu'un enrobage à base de chitosane contenant des agents anti brunissement pouvait retarder le mûrissement des racines de lotus. Amarante et Banks (2001) ont démontré qu'un enrobage à base de carnauba réduit la sénescence de poire et d'avocat.

L'action de l'enrobage sur le ralentissement de la maturation est corrélée avec la concentration de chitosane et ne dépend pas de la présence de la LPOS. Les valeurs de a\* des fruits traités avec la concentration de chitosane à 1% sont significativement ( $p < 0,05$ ) plus grandes que celles des fruits traités avec une concentration de chitosane de 1,5%. La présence du système enzymatique n'influence pas la coloration externe des fruits. Cependant, certains fruits traités avec la concentration de chitosane à 1,5% avec ou sans le système enzymatique présentaient des détériorations physiques qui se manifestaient par la présence de couleur noirâtre sur les mangues. Ces dégâts n'ont pas été observés sur les mangues traitées à 1% de chitosane.

Indice de couleur

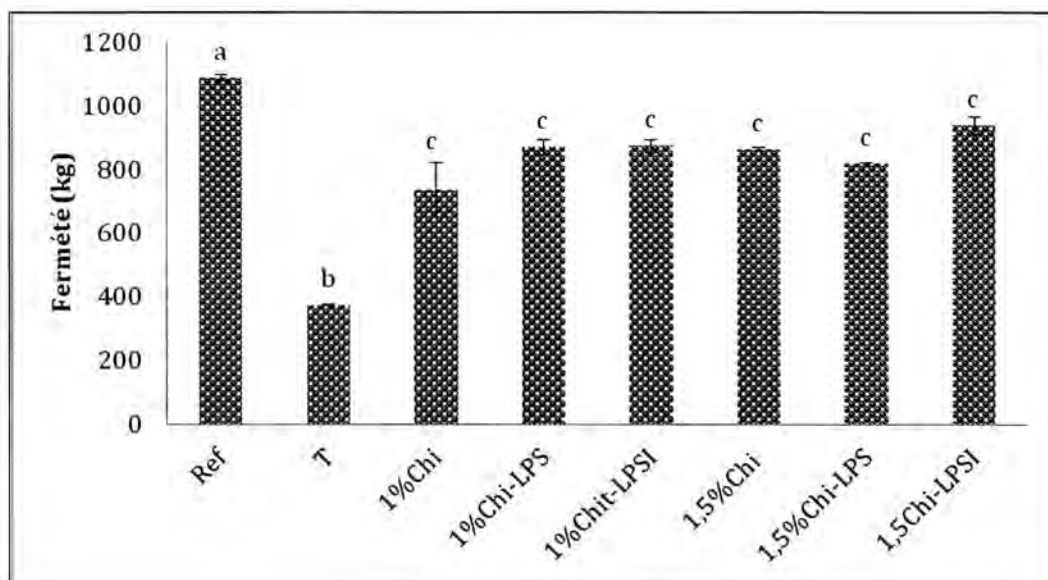


**Figure 4:**Indice de couleur provoqué par les différents enrobages

### VI.3.5 La fermeté

La fermeté des mangues enrobées et non enrobées décroît par rapport à la valeur de référence après 8 jours de conservation (figure 5). Néanmoins, elle est mieux préservée par l'application des enrobages comme on le voit sur la figure. La différence observée entre les mangues enrobées et non enrobées est significative, les fruits non enrobés présentent une fermeté inférieure à celles des fruits enrobés. Une comparaison globale montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les concentrations de chitosane (1% et 1,5%) utilisées, et entre les mangues traitées avec le système enzymatique (LPOS ou LPSI) et les mangues non traitées au système enzymatique. Ces résultats indiquent que la fermeté des fruits est préservée par l'enrobage de chitosane et non par la présence du système enzymatique.

La réduction de la respiration et la diminution des pertes d'eau pourraient être responsable de la rétention de la fermeté. Ces facteurs minimisent les pertes de turgescence des cellules et en ralentissent l'activité des enzymes de lyse PGA PG Beta gal des fruits au cours de la conservation. L'utilisation d'un enrobage approprié pourrait assurer le maintien de cette fermeté (Taşdelen and Bayindirli 1998). Divers travaux portant sur l'utilisation de chitosane dans la conservation post-récolte des fruits indiquent que ce polysaccharide pourrait maintenir la fermeté des fruits durant la conservation par exemple Malmiri et al. (2011) ont démontré ce résultat sur banane.



**Figure 5:** Effet des différents traitements sur la fermeté des mangues



### **VI.3.6 Changement de la composition chimique**

La composition chimique de la pulpe des fruits est un des paramètres indispensables pour évaluer la qualité gustative du fruit. L'évolution de la composition chimique des mangues après 8 jours de conservation a été étudiée. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Les modifications biochimiques des mangues au cours de la maturation induisent la réduction de l'acidité titrable, l'augmentation de pH, de la vitamine C et de l'extrait sec soluble.

Les enrobages ont un effet sur les changements biochimiques des mangues. Après sept jours de stockage, les mangues ont vu leurs compositions chimiques évoluées par contre on peut voir que l'évolution est ralentie lors de l'emploi des enrobages

#### **VI.3.6.1 pH**

La valeur du pH augmente avec la maturation du fruit. Le tableau 3 indique son augmentation dans toutes les mangues, avec un maximum observé dans les mangues non enrobées. Cependant il n'y a pas de différence significative entre les mangues enrobées quelle que soit la concentration de chitosane utilisée avec ou sans le système enzymatique. La réduction du pH par les emballages a été reportée par plusieurs auteurs (Srinivasa *et al*, 2002; Thumula 2006). Le changement de pH est attribué à la formation de sucres, des acides, etc durant la maturation.

#### **VI.3.6.2 Acidité titrable**

Contrairement au pH, l'acidité des fruits diminue au cours de la maturation. Les acides sont consommés au cours de la maturation et après la cueillette. L'acidité titrable des différents fruits a significativement diminuée par rapport à la valeur de référence. Lorsqu'on compare les mangues enrobées et les mangues non enrobées, on constate qu'il y a des différences significatives entre les valeurs de l'acidité titrable. Celles des mangues enrobées sont supérieures, probablement à cause du ralentissement de la respiration provoqué par la diminution du pourcentage de O<sub>2</sub> induite par l'enrobage. L'augmentation de l'acidité titrable des mangues par un enrobage de pectine et de chitosane a été démontré par de Medeiros *et al*, (2012). La présence du système enzymatique n'influence pas les valeurs de l'acidité titrable.

#### **VI.3.6.3 Extraits secs solubles**

Normalement, la teneur en extraits secs solubles augmente au cours de la maturation en raison de la dégradation des polysaccharides présents dans le fruit. L'amidon est hydrolysé en sucre (glucose, fructose, saccharose). L'augmentation du gout sucré est donc liée à la présence de

ces sucres. Elle peut aussi augmenter lorsque la perte d'eau augmente conduisant à l'augmentation des concentrations de sucres dans les tissus du fruit.

Les résultats du tableau 3 montrent que les extraits secs solubles augmentent dans toutes les mangues. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les E.S.S des mangues enrobées et les mangues non enrobées. Par contre le témoin montre une valeur maximale de 4,8 après 8 jours de stockage. La réduction des sucres dans les fruits enrobés suggère que ces sucres préformés se réduisent à rythme plus lent que dans le contrôle. de Medeiros et (2012) ont trouvé entre 11,5 et 13° Brix pour des variétés Tommy Atkins, ce qui conforte nos résultats.

Une comparaison globale entre les différents traitements au chitosane, montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les concentrations de 1% et 1,5% de chitosane. La remarque est identique entre les mangues traitées avec le système enzymatiques et celles non traitées.

#### **VI.3.6.4 Vitamine C (acide ascorbique)**

Initialement, les fruits ont une concentration en vitamine C élevée. Sa valeur décroît au cours de la maturation. Après 8 jours de conservation, la teneur de vitamine C des fruits non enrobés chute considérablement par rapport aux fruits enrobés. Le ralentissement de la maturation provoqué par l'enrobage de chitosane, réduit la dégradation de la vitamine C.

**Tableau 3: Composition chimique des mangues après conservation**

	Ph	Acidité titrable g/acide citrique/ 100g de pulpe	E.S.S (° Brix)	Vitamine C
<b>Référence 0 jour (initial)</b>	3,61 <sup>b</sup> ± 0,11	1,35 ± 0,03 <sup>a</sup>	12,56 <sup>a</sup> ± 0,07	29,36 <sup>a</sup> ± 0,35
<b>Témoin</b>	4,88 <sup>a</sup> ± 00	0,29±0,02 <sup>b</sup>	14,875 <sup>a</sup> ± 0,03	5,84 <sup>b</sup> ± 0,14
<b>1 % Chit</b>	4,195 <sup>b</sup> ± 0,12	0,58±0,03 <sup>c</sup>	14,65 <sup>a</sup> ± 0,07	25,48 <sup>c</sup> ± 5,2
<b>1 % Chit/LPS</b>	4,18 <sup>b</sup> ± 0,49	0,69±0,05 <sup>cd</sup>	13,425 <sup>a</sup> ± 0,1	23,04 <sup>c</sup> ± 2,6
<b>1 % Chit/LPSI</b>	3,83 <sup>b</sup> ± 0,20	0,76±0,13 <sup>cd</sup>	13 <sup>a</sup> ± 1,13	23,64 <sup>c</sup> ± 2,09
<b>1,5 % Chit</b>	4,07 <sup>b</sup> ± 0,04	0,81±0,01 <sup>d</sup>	13,65 <sup>a</sup> ± 0,78	23,54 <sup>c</sup> ± 0,5
<b>1,5 % Chit/LPS</b>	3,82 <sup>b</sup> ± 0,02	0,80±0,23 <sup>d</sup>	12,55 <sup>a</sup> ± 0,35	25,94 <sup>c</sup> ± 3,45
<b>1,5 % Chit/LPSI</b>	4,06 <sup>b</sup> ± 0,01	0,68±0,09 <sup>cd</sup>	12,8 <sup>a</sup> ± 0,42	24,80 <sup>c</sup> ± 4,56

#### VI.4 Conclusion

Cette étude démontre l'efficacité de l'enrobage à base de chitosane-LPOS dans la conservation post-récolte des fruits tropicaux. L'incorporation du LPOS au chitosane est efficace contre la détérioration microbiologique des mangues. Quant à l'aspect physicochimique, il semble être plus lié au chitosane qu'à l'ajout de LPOS.

Le chitosane présente une activité antimicrobienne qui sera renforcée par la présence du LPOS. La concentration de chitosane à 1% contenant la LPOS (1%Chitosane-LPOS) est suffisamment efficace contre les contaminations microbiennes, et dans le retardement des changements dus au mûrissement sans altérer la qualité des mangues. L'utilisation du couplage Chitosane-LPOS serait une approche dans la conservation et le transport des fruits tropicaux. Elle pourrait aussi être une alternative pour limiter l'utilisation des pesticides dans les traitements post-récoltes des fruits.

**CHAPITRE VII**  
**SYNTHESE DES RESULTATS**  
**ET DISCUSSION GENERALE**



## VII. Synthèses des résultats et discussion

La recherche de moyens efficaces et sûrs pour diminuer les pertes post-récolte des fruits tropicaux reste une préoccupation pour les pays en développement. S'il existe des produits chimiques pour palier à ce problème, la réticence des consommateurs envers les additifs chimiques a amené les scientifiques à s'orienter vers l'utilisation de molécules d'origine naturelle.

Pour augmenter la durée de conservation des produits tropicaux tels que les mangues, l'utilisation d'enrobages comestibles reste une alternative. Dans notre étude, nous avons combiné à l'enrobage de chitosane un système enzymatique possédant des propriétés antimicrobiennes. Les propriétés biocides des ions  $\text{OSCN}^-$  (avec/sans  $\text{OI}^-$ ) dépendent énormément de la stabilité de la peroxydase (LP). Contrairement à une enzyme libre, une enzyme immobilisée à un support est plus stable et plus résistante aux changements environnementaux, d'où l'importance d'immobiliser la LP sur le chitosane.

L'objectif de cette étude était de renforcer et de permettre le maintien de l'activité antimicrobienne du système enzymatique durant la conservation des fruits.

Nous avons travaillé sur les conditions expérimentales d'une bonne fixation du LPOS sur le chitosane en faisant varier les conditions environnementales (température, humidité et temps de conservation) et sur la synergie entre la concentration de la solution de chitosane et la LPOS pour mettre en évidence une meilleure efficacité du système enzymatique contre des souches pathogènes de la mangue. Les différentes études ont été menées dans un premier temps avec des films comestibles dans les conditions *in vitro* sur des boîtes de Pétri, avant d'être étudiées dans les conditions *in vivo* c'est à dire directement sur les mangues.

Les  $\text{SCN}^-$  et  $\text{I}^-$  se fixent de la même manière sur la molécule de LP, ce qui crée une compétition qui diminue l'efficacité du LPOS. Cependant certains travaux ont démontré que la présence d'iode pouvait augmenter l'activité antimicrobienne du LPOS contre certaines souches pathogènes. Ainsi, nous avons évalué l'influence de la présence d'iode sur l'activité antimicrobienne du LPOS.

En plus de servir de support pour le LPOS, le chitosane avait pour rôle de retarder la maturation des fruits. En effet un film à base de chitosane présente des perméabilités aux gaz et à la vapeur d'eau spécifique permettant de limiter ou moduler les flux d'oxygène et de gaz carbonique liés à la respiration du fruit. Ce film possède également des propriétés antimicrobiennes.

La première partie de cette étude (**chapitre II, Publication 1**) a été consacrée à l'amélioration des propriétés (perméabilités et mécaniques) des films de chitosane par utilisation de glycérol. Le glycérol a été utilisé pour améliorer la sensibilité à la vapeur d'eau et la friabilité du film de chitosane.

Le transfert des gaz respiratoires et la perméabilité à la vapeur d'eau sont les principales propriétés recherchées pour un film comestible destiné à la conservation des fruits. Les fruits climatériques comme les mangues présentent une forte consommation en oxygène au cours de la conservation. Ce phénomène se traduit par un mûrissement rapide et un flétrissement provoqué par la perte d'eau aboutissant à la sénescence du fruit.

L'objectif de cette partie de l'étude était de trouver les concentrations de chitosane et de glycérol optimales capables de produire un film qui puisse retarder la respiration, réduire la perte d'eau et possédant de bonnes propriétés mécaniques. Cette expérience a révélé que les deux facteurs (chitosane et glycérol) avaient une influence sur les propriétés du film. L'augmentation de la concentration de chitosane diminuait la respiration et diminuait la perte de la vapeur d'eau. Par contre, elle altérait l'élasticité des films. Quant au glycérol, sa forte concentration augmentait la perméabilité aux gaz ( $\text{CO}_2$  et  $\text{O}_2$ ), et améliorait les propriétés mécaniques du film en abaissant surtout sa friabilité.

Après une optimisation des paramètres, il été conclu que les valeurs optimales permettant d'obtenir les films désirés étaient de 1,5% de chitosane et 25% de glycérol (p/p de chitosane). Le système enzymatique a été incorporé à ce type de film dans la suite des travaux.

La deuxième étape a permis d'étudier l'influence de la température et de l'humidité relative sur la production de molécules actives du LPOS dans le film de chitosane (**Publication 2**). La production et la persistance des molécules antimicrobiennes du LPOS dans les films (1,5%), ont été évaluées en fonction de la température et de l'humidité relative, deux facteurs majeurs dans la conservation des mangues.

Si l'augmentation de température influençait positivement la production des ions actifs ( $\text{OSCN}^-$ ,  $\text{OI}^-$ ), la marge d'humidité relative utilisée (50-90%) n'avait pas d'influence significative sur la production de ces ions. Ensuite, les activités antibactériennes de trois types de films (1,5% Chitosane, 1,5% Chitosane-LPOS et 1,5% Chitosane-LPOSI) ont été comparées pour leur efficacité contre *Xanthomonas campestris* pv *mangifera indica*, bactérie responsable de gros dégâts en cours de conservation des mangues. Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les films à 1,5% Chitosane-LPOS et à 1,5%

Chitosane-LPOSI. Par contre le film ne contenant pas de système enzymatique (1,5% Chitosane) présentait une activité antimicrobienne beaucoup plus faible. Ces résultats indiquaient clairement que les systèmes enzymatiques utilisés renforçaient l'activité antibactérienne du chitosane, et la présence de l'iode n'influencait pas l'action du LPOS contre cette souche bactérienne. La présence des systèmes enzymatiques (LPOS ou LPOSI) ne modifiait pas non plus la perméabilité des films comestibles aux gaz et à la vapeur d'eau.

Après avoir opté pour l'utilisation de la concentration de 1,5% de chitosane dans les deux premières parties, nous avons pensé que la concentration de chitosane pouvait influencer la fixation du LPOS. Dans **les chapitres III (Publication 3) et IV**, nous avons étudié l'interaction des systèmes enzymatiques avec trois concentrations différentes de chitosane (0,5 ; 1 et 1,5%). Les films de chitosane ont été étudiés soit sans adjonction de LPS soit avec du LPOS ou du LPSOI. Ils ont ensuite été testés sur différentes souches pathogènes de la mangue. La sensibilité de chaque souche a été évaluée durant le temps en présence de chaque film. Les résultats ont montré que les films de chitosane utilisés sans le système LPOS, pouvaient avoir un effet bactériostatique lorsque la concentration de chitosane utilisée était de 1,5%. Cette même concentration de chitosane présentait également des effets antifongiques variables contre les souches testées. Les souches *C. gloeosporioides* 64, *Lasiodiplodia ngr* 05 et *pestalotiopsis* étaient beaucoup sensibles contrairement aux souches *C. gloeosporioides* 4612, *C. gloeosporioides* 62 et la souche *phomopsis*. Après deux semaines de conservation, les index fongicides des différentes souches chutent pratiquement à 0 %. Ces résultats montrent que le chitosane à 1,5% possède des propriétés fongistatiques.

La présence des systèmes enzymatiques (LPOS et LPOSI) au côté du chitosane a influencé la réponse des souches. Quelle que soit la concentration de chitosane utilisé, le système chitosane-LPOS présentait une activité bactéricide contre la souche *X. campestris. pv mangifera indica*. Par contre la présence d'iode dans le LPOS inhibe cette activité lorsqu'on fixe le système à 0,5% de chitosane.

Les souches de moisissures utilisées présentent des sensibilités variables à l'égard des couplages chitosane-LPOS et chitosane-LPOSI. La présence d'iode au côté du LPOS agit différemment sur les souches. Si elle augmente l'efficacité sur des souches telle que le *C. gloeosporioides* C4612, elle inhibe l'effet antifongique du LPOS contre le *Phomopsis*. Ces résultats mettent en évidence les sensibilités des souches pathogènes vis à vis des ions OSCN<sup>-</sup> et/ou OI<sup>-</sup>. Les sensibilités des souches étaient plus prononcées lorsque les systèmes enzymatiques étaient fixés à 1 et 1,5% de chitosane ; cela indique également qu'il existe une

corrélation positive entre l'activité antimicrobienne du LPOS et l'augmentation de la concentration de chitosane. Il est intéressant de noter que la présence des systèmes enzymatiques n'a pas influencé significativement les propriétés des films comestibles de chitosane.

Le **chapitre V** présente les résultats des différents enrobages de chitosane avec ou sans les systèmes enzymatiques sur la conservation des mangues de la variété 'Kent'. Des analyses microbiologiques et physicochimiques ont été réalisées en cours de stockage. Les résultats ont montré que la combinaison du système lactopéroxydase et du chitosane pouvait avoir un effet bénéfique sur la conservation des mangues. L'enrobage de chitosane retardait le mûrissement des mangues entraînant ainsi le maintien de leur fermeté, de leur couleur et le ralentissement de la respiration et de la perte d'eau. A une concentration élevée de 1,5%, le chitosane seul inhibe la croissance des souches pathogènes. Quant à la présence du LPOS avec le chitosane, nous avons démontré qu'elle améliorait l'activité antifongique du chitosane sans altérer les propriétés physiques de l'enrobage. L'activité antifongique du système enzymatique croît avec la concentration de chitosane. Ceci suggère qu'il existe un effet d'interaction positive entre le système enzymatique et la concentration de chitosane comme indiqué dans les chapitres III et IV. Les résultats obtenus sur les effets antifongiques ont également montré, qu'en général la présence d'iode n'a pas un effet prononcé sur l'activité antifongique du LPOS. Les traitements des mangues par les solutions de chitosane à la concentration à 1% contenant le LPOS ont donné les meilleurs résultats. Non seulement ces traitements ont permis de ralentir le mûrissement de la mangue et la prolifération des pathogènes mais ils ont aussi permis d'éviter le brunissement enzymatique des mangues.

A la base sur l'étude du film seul nous avons conclu que 1.5% de chitosane avec 25% de glycérol correspondant aux meilleures concentrations permettant d'obtenir un film aux caractéristiques que nous désirions. Il s'avère que ces concentrations ne sont pas celles qui permettent la meilleure fixation ou le meilleur fonctionnement de la LPSO dans la conservation des mangues.



## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE**

## **Conclusion Générale et Perspectives**

L'utilisation d'un système enzymatique d'origine naturelle intégré dans un biopolymère de chitosane a donné d'excellents résultats pour la conservation de la mangue. Ces résultats montrent que le système chitosane-LPOS est une méthode sûre et saine utilisable qui pourrait permettre d'améliorer d'une part le flux d'exportation mais aussi la qualité de la matière première car le fait de réguler le mûrissement du fruit et le de limiter le développement des pathogènes pourrait faciliter l'exportation de fruit cueilli à une maturité plus avancée et donc de meilleure qualité à leur arrivée sur le marché.

L'enrobage à base de 1% de chitosane a permis de mieux fixer le système enzymatique et de maintenir les mangues en bon état sanitaire. La présence d'iode dans le système lactoperoxydase n'agit pas de manière significative sur la conservation des mangues.

L'utilisation d'un enrobage de chitosane contenant le LPOS autour des mangues peut donc être proposée comme une alternative contre l'utilisation excessive des pesticides synthétiques dans la conservation post-récolte des fruits tropicaux.

## **Perspectives**

Pour la continuité de cette étude, plusieurs pistes peuvent être envisagées telles que :

- L'étude comparative du traitement du couplage chitosane-LPOS contre plusieurs variétés de mangues. Cette étude servira à déterminer la sensibilité de diverses espèces de mangue.
- D'autres méthodes d'immobilisation telle que l'adsorption ou la microencapsulation pourraient être utilisées pour immobiliser le LPOS dans la matrice, pour améliorer éventuellement l'efficacité de production d'ions du système LPSO.
- Le LPOS sera combiné à d'autres types d'enrobage pour ainsi étudier l'interaction entre l'enrobage et le système.
- Il serait intéressant de se pencher sur la durabilité du système enzymatique comment faire pour qu'il continue à agir plus longtemps ? comment faire pour maintenir les ions dans l'enrobage ?
- Comment agissent réellement les ions sur les pathogènes ?
- Faire une étude économique pour connaître le prix de l'application de la technique
- Comment cet enrobage pourrait-il être appliqué industriellement ?
- Peut-on appliquer cette technique sur les chaînes de conditionnement actuelles ?

## References

- Abd-ALLA, M., A & Wafaa, H., M (2010).** New Safe Methods for Controlling Anthracnose Disease of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruits Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). Journal of American Science 8: :331-367.
- Adolphe, Y. (2006).** Étude du fonctionnement du système lactoperoxydasique et validation de son effet inhibiteur vis-à-vis de flores du poisson.
- Adolphe, Y., Jacquot, M., Linder, M., Revol-Junelles, A.-M. & Milliere, J.-B. (2006).** Optimization of the components concentrations of the lactoperoxidase system by RSM. Journal of Applied Microbiology: 1034-1042.
- Alexeev, V., Igoucheva, O., Domashenko, A., Cotsarelis, G. & Yoon, K. (2000).** Localized in vivo genotypic and phenotypic correction of the albino mutation in skin by RNA-DNA oligonucleotide. Nature biotechnology 18 (1): 43-47.
- Ali, A., Muhammad, M. T. M., Sijam, K. & Siddiqui, Y. (2011).** Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. Food Chemistry 124 (2): 620-626.
- Amarante, C. & Banks, N. H. (2001).** Postharvest physiology and quality of coated fruits and vegetables. Horticultural reviews 26: 161-238.
- Amborabe, E., Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Dhuicq, L. & Vernet, G. (2004).** Stimulation des défenses naturelles de la vigne: Essais d'emploi du chitosan contre *Botrytis cinerea*. Phytoma, la défense des végétaux(571): 26-29.
- Amiali, M. (1999).** Caractérisation des films de chitosane par la perméabilité à la vapeur d'eau et aux gaz (CO<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), National Library of Canada. Bibliothèque nationale du Canada.
- Ana, N., H , Miguel, G., V., Leticia, V., Gloria, E., M & María, G. (2010).** Effect of chitosan on three isolates of *Rhizopus stolonifer* obtained from peach, papaya and tomato. Fruits 65: 245-225.
- Appendini, P. & Hotchkiss, J. H. (2002).** Review of antimicrobial food packaging. Innovative Food Science & Emerging Technologies 3(2): 113-126.
- Arauz, L. F. (2000).** Mango Anthracnose: Economic Impact and Current Options For Integrated Managaement. Plant Disease 84 (6): 600-611.
- Arvanitoyannis, I., Kolokuris, I., Nakayama, A., Yamamoto, N. & Aiba, S. (1997).** Physico-chemical studies of chitosan-poly (vinyl alcohol) blends plasticized with sorbitol and sucrose. Carbohydrate Polymers 34(1-2): 9-19.



- ASTM (2000).** Standard Test Method for Water Vapour Transmission of Materials. American Society for Testing and Materials Philadelphia.
- ASTM (2000).** Standard Test Method for Water Vapour Transmission of Materials. Philadelphia.
- ASTM (2001).** Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, D 882-00. Philadelphia.
- Atia, M. M. M., Buchenauer, H., Aly, A. Z. & Abou-Zaid, M. I. (2005).** Antifungal activity of chitosan against *Phytophthora infestans* and activation of defence mechanisms in tomato to late blight. *Biological Agriculture & Horticulture* 23: 175-197.
- Aune, T. M. & Thomas, E. L. (1977).** Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase-catalysed oxidation of thiocyanate ion *European Journal of Biochemistry* 80: 209-214.
- Aydinli, M. & Tutas, M. (2000).** Water sorption and water vapour permeability properties of polysaccharide (locust bean gum) based edible films. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 33 (1): 63-67.
- Ayranci, E. & Tunc, S. (2003).** A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. *Food Chemistry* 80: 423-431.
- Bafodé, B., S (1988).** Projet de transformation et de conditionnement des mangues à Boundiali en Côte d'Ivoire. Montpellier.
- Bai, R., Mei-yu, H. & Ying-yan, J. (1988).** Selective permeabilities of chitosane acetic acid complexe membrane and chitosan - polymer complexe membranes for oxygen and carbon dioxide. *Polymer Bulletin* (20): 83-88.
- Baldwin, A., E. (1994).** Edible Coating for Fresh Fruits and Vegetable: Past, Present, and Future. *Edible Films and Coatings to Improve Food Quality*. J. M. Krochta, Baldwin, E., Nisperos-Carriedo, M.O. Pennsylvania: 25-64.
- Banik, A., K , Kaiser, S., A & Dhua, R., S (1998).** Influence of temperature and humidity on the growth and development of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Diplodia natalensis* causing postharvest fruit rot of mango. *Advances in Plant Sciences* 11: 51-57.
- Barreto, P. L. M., Pires, A. T. N. & Soldi, V. (2003).** Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation and Stability* 79 (1): 147-152.



- Barrett, N., G & Lewis, M., J (1999).** Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *Journal of Dairy Research* 66: 73-80.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E. & Wilson, C. L. (2003).** Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22 (9): 1087-1092.
- Belding, M. E., Klebanoff, S. J. & Ray, C. G. (1970).** Peroxidase-mediated virucidal systems. *Science* 167(3915): 195-196.
- Bell, A. A., Hubbard, J. C. & Li, L. (1998).** Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of *Fusarium yellows* of celery. *Plant Disease*,(82): 322-328.
- Ben-Shalom, N. & Fallik, E. (2003).** Further suppression of *Botrytis cinerea* disease in cucumber seedlings by chitosan–copper complex as compared with chitosan alone. *Phytoparasitica* (31): 99-102.
- Ben-Yehoshua, S. (1987).** Transpiration, water stress, and gas exchange. WEICHMANN, J. *Postharvest Physiology of Vegetables*. New York: Marcel Dekker: 113-170.
- Benhamou, N., Lafontaine, P., J & Nicole, M. (1994).** Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology* 84: 1432-1444.
- Bin, L., Xiao, W., Ruoxia, C., Weiguo, H. & Guanlin, X. (2008).** Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima* *Carbohydrate Polymers* 72: 287-292.
- Bosch, E., H, Van Doorne, H. & De Vries, S. (2000).** The lactoperoxidase system: the influence of iodide and the chemical and antimicrobial stability over the period of about 18 months. *Journal of Applied Microbiology* 89: 215-224.
- Bosch, E. H., Van Doorne, H. & De Vries, S. (2000).** The lactoperoxidase system: the influence of iodide and the chemical and antimicrobial stability over the period of about 18 months. *Journal of Applied Microbiology* 89: 215-224.
- Bourgeois, C., M & Larpent, J., P (1996).** *Microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentations alimentaires*. Paris Lavoisier.
- Boussoel, N., Mathieu, F., Revol-Junelles, A. M. & Millière, J. B. (2000).** Effects of combinations of lactoperoxidase system and nisin on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in skim milk. *International Journal of Food Microbiology* 61 (2): 169-175.
- Bowers, L. D. (1986).** Applications of immobilized biocatalysts in chemical analysis. *Analytical Chemistry* 58 (4): 513A-530A.

- Burg, S. P. & Burg, E. A. (1962).** Role of ethylene in fruit ripening. *Plant Physiology* 37(2): 179.
- Butler, B. L., Vergano, P. J., Testin, R. F., M, B. f. & Wiles, J. L. (1996).** Mechanical and barrier properties of edible chitosan film as affected by composition and storage. *Journal of Food Science* 64 (5): 953-996 951.
- Cailliez-Grimal, C., Revol-Juelles, A. M., Linder, M. & Milliere, J. B. (2002).** Antimicrobial activity spectra of the glucose/glucose-oxidase and the lactoperoxidase systems (SCN<sup>-</sup>) modified by I-or IO<sub>3</sub>-anion. *Milchwissenschaft* 57 (11-12): 656-660.
- Campbell, R. J. (1992).** A guide to mangos in Florida, Fairchild Tropical Garden.
- Caner, C., Vergano, P., J & Wiles, J., L (2006).** Chitosan Film Mechanical and Permeation Properties as Affected by Acid, Plasticizer, and Storage. *Journal of Food Science* 63: 1049-1053.
- Caner, C., Vergano, P. & Wiles, J. (1998).** Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. *Journal of Food Science* 63(6): 1049-1053.
- Cao, N., Yang, X. & Fu, Y. (2009).** Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food hydrocolloids* 23(3): 729-735.
- Carlsson, J. (1983).** Catalatic activity of lactoperoxidase in the presence of SCN<sup>-</sup>. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 116(2): 568-573.
- Cenatiempo, Y., Berjeaud, J., Biet, F., Fremaux, C., Hechard, Y. & Robichon, D. (1996).** Bactériocines de bactéries lactiques: données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Le Lait* 76 (1-2): 169-177.
- Cervera, M. F., Karjalainen, M., Airaksinen, S., Rantanen, J., Krogars, K., Heinämäki, J., Colarte, A. I. & Yliruusi, J. (2004).** Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58 (1): 69-76.
- Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A. & Chatterjee, B. (2005).** Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochemistry* 40(1): 395-400.
- Chen, H. (1995).** Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science* 78(11): 2563-2583.
- Chen, M., Yeh, G., H & Chiang, B. (1996).** Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. *J. Food Process Preserv*(20): 379-390.

- Chillo, S., Flores, S., Mastromatteo, M., Conte, A., Gerschenson, L. & Del Nobile, M. A. (2008).** Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering* 88(2): 159-168.
- Chung, Y. C., Wang, H. L., Chen, Y. M. & Li, S. L. (2003).** Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology* 88: 179-184.
- Cissé, M., Montet, D., Tapia, M. S., Loiseau, G. & Ducamp-Collin, M. N. (2012).** Influence of temperature and relative humidity on the immobilized lactoperoxidase system in a functional chitosan film. *Food Hydrocolloids* 28(2): 361-366.
- Coma, V., Deschamps, A. & MARTIAL-GROS, A. (2003).** Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan Polymer-Antimicrobial Activity Assessment on Dairy-Related Contaminants. *Journal of Food Science* 68(9): 2788-2792.
- Cowan, D. A. & Fernandez-Lafuente, R. (2011).** Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme and Microbial Technology* 49(4): 326-346.
- Cuq, B., Aymard, C., Cuq, J., L & Guilbert, S. (1995).** Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. *Journal of Food Science* 60(6): 1369-1374.
- Cutter, C. N. (2006).** Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. *Meat Science* 74: 131–142.
- Das, R., Chutia, M., Das, K. & Jha, D. (2010).** Factors affecting sporulation of *Pestalotiopsis disseminata* causing grey blight disease of *Persea bombycina* Kost., the primary food plant of muga silkworm. *Crop Protection* 29(9): 963-968.
- Dawson, P., L, Carl, G., D, Acton, J., C & Han, I., Y (2002).** Effect of lauric acid and nisin impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. *Poult Sci* 81(5): 721- 726.
- de Lapeyre de Bellaire, L. & Dubois, C. (1997).** Distribution of thiabendazole-resistant *Colletotrichum musae* isolates from Guadeloupe banana plantations. *Plant Disease* 81: 1378-1383.
- de S. Medeiros, B. G., Pinheiro, A. C., Carneiro-da-Cunha, M. G. & Vicente, A. A. (2012).** Development and characterization of a nanomultilayer coating of pectin and chitosan -Evaluation of its gas barrier properties and application on ‘Tommy Atkins’ mangoes. *Journal of Food Engineering* 110(3): 457-464.

- De Wit, J. & Van Hooydonk, A. (1996).** Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Nederlands melk en Zuiveltijdschrift* 50(2): 227-244.
- Dean, J., P & Zottola, E. A. (1996).** Use of nisin in ice cream and effect on the survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot* 59: 476-480.
- Dean, J. P. & Zottola, E., A (1996).** Use of nisin in ice cream and effect on the survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot* 59: 476-480.
- Deng, Y., Wu, Y. & Li, Y. (2006).** Physiological responses and quality attributes of 'Kyoho' grapes to controlled atmosphere storage. *LWT-Food Science and Technology* 39(6): 584-590.
- Denis, F. & Ramet, J. P. (1989).** Antibacterial activity of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in trypticase soy broth, UHT milk and French soft cheese. *Journal of Food Protection* 52(10): 706-711.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A. & Debevere, J. (2004).** Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 21: 703-714.
- Di Gioia, L. & Guilbert, S. (1999).** Corn protein-based thermoplastic resins: Effect of some polar and amphiphilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (3): 1254-1261.
- Di Martino, A., Sittinger, M. & Risbud, M. V. (2005).** Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 26 (30): 5983-5990.
- Dionysius, D., Grieve, P. & Vos, A. (1992).** Studies on the lactoperoxidase system: reaction kinetics and antibacterial activity using two methods for hydrogen peroxide generation. *Journal of Applied Microbiology* 72 (2): 146-153.
- Dodd, J., C , Estrada, A., B , Matcham, J., Jefferies, P. & Jeger, M., J (1991).** The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. *Plant Pathology* 40: 568-575.
- Dodd, J., Prusky, D. & Jeffries, P. (1996).** Fruit diseases.
- Doehlert, D. H. (1970).** Uniform shell designs. *Appl stat* 19: 231-239.
- Doyle, M. P. & Marth, E. H. (1978).** Degradation of aflatoxin by lactoperoxidase. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* 166(5): 271-273.
- Droby, S. & Goldman, A. (1987).** Induction of antifungal resorcinols in flesh of unripe mango fruits and its relation to latent infection by *Alternaria alternata*. *Physiological and molecular plant pathology* 30(2): 285-292.



- Ducamp-Collin, M. N., Loiseau, G. & Dornier, M. (2006).** Effect of the lactoperoxidase system against causal agents of post harvest mango diseases.
- Dull, T. J., Uyeda, C., Strosberg, A. D., Nedwin, G. & Seilhamer, J. J. (1990).** Molecular cloning of cDNAs encoding bovine and human lactoperoxidase. *DNA and cell biology* 9(7): 499-509.
- Dutta, P. K., Ravikumar, M. N. V. & Dutta, J. (2002).** Chitin and Chitosan for versatile applications. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* 42 (3): 307-354.
- Earnshaw, R. G., Banks, J. G., Francotte, C. & Defrise, D. (1990).** Inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in an infant milk formula by an activated lactoperoxidase system. *Journal of Food Protection* 53(2): 170-172.
- Eikenes, M., Alfredsen, G., Christensen, B. E., Militz, H. & Solheim, H. (2005).** Comparison of chitosans with different molecular weights as possible wood preservatives. *Journal of Wood Science* 51(4): 387-394.
- El-Tahlawy, K. F., El-Bendary, M. A., Elhendawy, A. G. & Hudson, S. M. (2005).** The antimicrobial activity of cotton fabrics treated with different crosslinking agents and chitosan. *Carbohydrate Polymers* 60(4): 421-430.
- El Ghaouth, A., Ponnampalam, R., Castaigne, F. & Arul, J. (1992).** Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *HortScience* 27(9): 1016-1018.
- El Sheikha, A. F., Zaki, M. S., Bakr, A. A., El Habashy, M. M. & Montet, D. (2010).** Biochemical And Sensory Quality Of *Physalis* (*Physalis Pubescens* L.) Juice. *Journal of food processing and preservation* 34(3): 541-555.
- Elson, C. W., Hayes, E. R. & Lidster, P. D. (1985).** Development of the differentially permeable hit coatings 'Nutn Save' For the Modified atmosphere storage of fruit. In *Proceeding of the fourth national controlled atmosphere. research conf.*, S. M. Blankenship (ed.), Raleigh, NC : Dept. of Hort. Sci: 126, 248.
- Engel, K. H. & Tressl, R. (1983).** Studies on the volatile components of two mango varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31(4): 796-801.
- Epure, V., Griffon, M., Pollet, E. & Averous, L. (2011).** Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. *Carbohydrate Polymers* 83: 947-952.
- FAO (1999).** Manual on the use of the LP-system in milk handling and preservation. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Fatih, Y. G., Yener, F. Y. & Yemenicioglu, A. (2009).** Antimicrobial Activity of Lactoperoxidase System Incorporated into Cross-Linked Alginate Films. *Journal of Food Science* 74 (2): 73-79.
- Fei Liu, X., Lin Guan, Y., Zhi Yang, D., Li, Z. & De Yao, K. (2001).** Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of applied polymer science* 79 (7): 1324-1335.
- Fennema, O., Donhowe, I. G. & Kester, J. (1994).** Lipid type and location of the relative humidity gradient influence on the barrier properties of lipids to water vapor. *Journal of Food Engineering* 22(1-4): 225-239.
- Ferrari, R. P., Laurenti, E., Cecchini, P. I., Gambino, O. & Sondergaard, I. (1995).** Spectroscopic investigations on the highly purified lactoperoxidase Fe (III)-heme catalytic site. *Journal of inorganic biochemistry* 58(2): 109-127.
- Franssen, L. R. & Krochta, J. M. (2003).** Edible coatings containing natural antimicrobials for processed foods. *Natural antimicrobials for minimal processing of foods*: 250-262
- Fruitrop (2009).** Version française, Février 2009, n° 164.
- Gagnevin, L. & Pruvost, O. (2001).** Epidemiology and Control of Mango Bacterial Black Spot. *Plant Disease* 85: 928-935.
- Gallo, J. A. Q., Debeaufort, F. & Voilley, A. (1999).** Interactions between aroma and edible films. 1. Permeability of methylcellulose and low-density polyethylene films to methyl ketones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(1): 108-113.
- Garcia, M., Martino, M. & Zaritzky, N. (2000).** Lipid Addition to Improve Barrier Properties of Edible Starch-based Films and Coatings. *Journal of Food Science* 65(6): 941-944.
- Gennadios, A. & Weller, C. L. (1990).** Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology* 44(10): 63-69.
- Glicksman, M. (1982).** *Food Hydrocolloids* Florida, CRC Press.
- Gontard, N., Guilbert, S. & Cuq, J. L. (1993).** Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten films. *Journal of Food Science* 58: 206-211.
- Gontard, N., Thibault, R., Cuq, J. L & Guibert, S. (1996).** Influence of relative humidity and film composition on oxygene and carbon dioxyde permeability of edible film. *J.Agr. Food Chem.* 44: 1064 -1069.

- Gontard, N., Thibault, R., Cuq, J. L. & Guibert, S. (1996).** Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeability of edible film. *Journal of Agriculture. Food Chem*(44): 1064 -1069.
- Greener, D., I. & Fennema, O. (1994).** Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. In *Edible Films and Coatings to Improve Food Quality*. Krochta, J.M., Baldwin, E., Nisperos-Carriedo, M.O. Ed. Technomic Publishing Company. Inc., Pennsylvania, : 1-24.
- Griffiths, M. (1986).** Use of milk enzymes as indices of heat treatment. *Journal of Food Protection* 49(9): 696-705.
- Guilbert, S., Cuq, B. & Gontard, N. (1997).** Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives & Contaminants* 14(6-7): 741-751.
- Hagenmaier, R. D. (2005).** A comparison of ethane, ethylene and CO<sub>2</sub> peel permeance for fruits with different coatings. *Postharvest Biology and Technology* 37(1): 56-64.
- Hamdine, M., Heuzey, M.-C. & Bégin, A. (2005).** Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels. *International Journal of Biological Macromolecules* 37 (3): 134-142.
- Han (2000).** Antimicrobial food packaging. *Food Technology* 54(3): pp. 56–65.
- Haouz, A., Glandières, J. M. & Alpert, B. (2001).** Involvement of protein dynamics in enzyme stability: The case of glucose oxidase. *FEBS letters* 506 (3): 216-220.
- Hawthorne, B., T (1989).** Effects of cultural practices on the incidence of storage rots in *Cucurbita* spp. . *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 17(1): 49-54.
- Helander, I., M, Nurmiäho-Lassila, E., L, Ahvenainen, R., Rhoades, J. & Roller, S. (2001).** Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 71(2-3): 235-244.
- Henning, S., Metz, R. & Hammes, W. P. (1986).** New aspects for the application of nisin to food products based on its mode of action. *International Journal of Food Microbiology* 3 (3): 135-141.
- Hunter, J. S. (1959).** Determination of optimum operating conditions by experimental methods. *Industrial Quality Control* 15: 6-12.
- IDF (1988).** Code of practice for the preservation of raw milk by the lactoperoxidase system. *Bulletin of the International Dairy Federation*: 1-15.
- Jack, R. W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B. E., Hillier, A. J., Wettenhall, R., Hickey, M. W. & Coventry, M. J. (1996).** Characterization of the



chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Applied and environmental microbiology* 62(8): 2897-2903.

**Jacob, B., Antony, E., Sreekumar, B. & Haridas, M. (2000).** Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goatmilk lactoperoxidase. *Life Sci* 66: 2433-2439.

**Jacob, B. M., Antony, E., Sreekumar, B. & Haridas, M. (2000).** Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goatmilk lactoperoxidase. *Life Sci* 66: 2433-2439.

**Jiang, Y., Li, J. & Jiang, W. (2005).** Effects of chitosan coating on shelf life of cold-stored litchi fruit at ambient temperature. *LWT-food Science and Technology* 38(7): 757-761.

**Jiang, Y. & Li, Y. (2001).** Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry* 73(2): 139-143.

**Johnson, G., I & Sangchote, S. (1994).** Control of postharvest diseases of tropical fruits: challenges for the 21st century. *Postharvest Handling of Tropical Fruits*. B. Champ, R, E. Highley & G. Johnson, I. Canberra Australian Center for International Agricultural Research: 140-167.

**Johnson, G., Mead, A., Cooke, A. & Dean, J. (1992).** Mango stem end rot pathogens: Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology* 120(2): 225-234.

**Jung, D. S., Bodyfelt, F. W. & Daeschel, M. A. (1992).** Influence of Fat and Emulsifiers on the Efficacy of Nisin in Inhibiting *Listeria monocytogenes* in Fluid Milk. *Journal of Dairy Science* 75(2): 387-393.

**Kader, A., A (1987).** Respiration and gas exchange of vegetables. Pages 25-43. *Post harvest Physiology of Vegetables*. J. Weichmann. New York, Marcel Dekker.

**Kaplan, D. L., Mayer, J., M, Ball, D., Mc Cassic, J., Allen, A. L. & Stenhouse, P. (1993).** Fundamentals of biodegradable polymers. *Biodegradable Pol ymers and Packaging*. D. K. a. E. T. C. Ching. PA, Technomic Publishing, Lancaster: 1-42.

**Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H. & Wormald, P. J. (2006).** An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *Journal of microbiological methods* 65(1): 38-48.



- Kefialew, Y. & Ayalew, A. (2008).** Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biology and Technology* 50: 8-11.
- Kennedy, J., F. & Cabral, J., M., S (1983).** Immobilized enzymes. . Scouten WH, Solid phase biochemistry. W. John & Sons. New York, Analytical and synthetic aspects: 253–391.
- Kennedy, M., O'rourke, A., L , McLay, J. & Simmonds, R. (2000).** Use of a ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. *International Journal of Food Microbiology* 57: 147-158.
- Khuri, A. L. & Cornell, J. A. (1987).** Response surface designs and analysis. New York, USA: Marcel Dekker.
- Kobiler, I., Shalom, Y., Roth, I., Akerman, M., Vinokur, Y., Fuchs, Y. & Prusky, D. (2001).** Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the incidence of side and stem end rots in mango fruits. *Postharvest Biology and Technology* 23(1): 23-32.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. & Park, H. J. (2010).** Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 144(1): 51-63.
- Korsten, L. (2006).** Advances in control of postharvest diseases in tropical fresh produce. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation* 1(1): 48-61.
- Krajewska, B. (2004).** Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35(2-3): 126-139.
- Król, E. (2005).** «Influence of Some Chemicals on the Viability of *Phomopsis viticola* Sacc. Spores». *Journal of Plant Protection Research* 45(3): 195-203.
- Kussendrager, K. & Hooijdonk, A. (2000).** Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Brit J Nutr.* 84: 19-25.
- Laflamme, P., Benhamou, N., Bussi res, G. & Dessureault, M. (2000).** Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Canadian journal of botany* 77(10): 1460-1468.
- Langley-Danysz, P. (1989).** Lacto-protéines: le lait anti-microbien. *Rev Ind Agro-Alim* 423: 44-47.
- Laroussilhe, D., F, Ed. (1980).** Le manguier. Collection Techniques Agricoles et Productions Tropicales Paris.

- Le Nguyen, D. D., Ducamp, M. N., Dornier, M., Montet, D. & Loiseau, G. (2005).** Effect of the lactoperoxidase system against three major causal agents of disease in mangoes. *Journal of Food Protection* 68(7): 1497-1500.
- Lee, C., An, D., Park, H. & Lee, D. (2003).** Wide-spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating. *Pack Technol Sci* 16: 99-106.
- Lehrer, R., I. (1969).** Antifungal effects of peroxidase systems. *Journal of Bacteriology* 99: 361-365.
- Li, B., Kennedy, J., F, Peng, J., L, Yie, X. & Xie, B., J (2006).** Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydrate Polymers* 65(4): 488-494.
- Li, B., Wang, X., Chen, R., Huangfu, W. & Guanlin, X. (2008).** Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Carbohydrate Polymers* 72: 287-292.
- Li, Y., Chen, X. G., Liu, N., Liu, C. S., Liu, C. G. & Meng, X. H. (2007).** Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. *Carbohydrate Polymers* 67: 227-232.
- Lian, Z.-X., Ma, Z.-S., Wei, J. & Liu, H. (2012).** Preparation and characterization of immobilized lysozyme and evaluation of its application in edible coatings. *Process Biochemistry* 47(2): 201-208.
- Liu, J., Tian, S., Meng, X. & Xu, Y. (2007).** Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 44(3): 300-306.
- Liu, N., Chen, X., G, Park, H., J, Liu, C., G, Liu, C., S, Meng, X., H & Yu, L., J (2006).** Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers* 64(1): 60-65.
- Liu, N., Chen, X. G., Park, H. J., Liu, C. G., Liu, C. S., Meng, X. H. & Yu, L. J. (2006).** Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers* 64(1): 60-65.
- Loiseau, G., Faye, B., Serikbaeva, A. & Montet, D. (2001).** International Conference on new horizons in biotechnology, 18-21 avril 2001, Trivandrum, Inde.
- Losso, J., Nakai, S. & Charter, E. (2000).** Lysozyme. *Natural food Antimicrobial Systems* (Naidu AS ed.): 185-210.

- MacLeod, A. J. & Snyder, C. H. (1985).** Volatile components of two cultivars of mango from Florida. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33(3): 380-384.
- Marcozzi, G., Di Domenico, C. & Spreti, N. (1998).** Effects of surfactants on the stabilization of the bovine lactoperoxidase activity. *Biotechnology progress* 14(4): 653-656.
- Marshall, E., V & Reiter, B. (1980).** Comparison of the Antibacterial Activity of the Hypothiocyanite Anion towards *Streptococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*(120): 513-516.
- Martin-Hernandez, M., Markwijk, B. W. & Vreeman, H. (1990).** Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 44(3-4): 213-231.
- Martínez-Camacho, A., P, Cortez-Rocha, M., O, Ezquerria-Brauer, J., M, Graciano-Verdugo, A., Z, Rodriguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M., M, Yépiz-Gómez, M., S & Plascencia-Jatomea, M. (2010).** Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers* 82(2): 305-315.
- Masschalck, B. & Michiels, C. W. (2003).** Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical reviews in microbiology* 29(3): 191-214.
- McLay, J. C., Kennedy, M. J., O'Rourke, A. L., Elliot, R. M. & Simmonds, R. S. (2002).** Inhibition of bacterial foodborne pathogens by the lactoperoxidase system in combination with monolaurin. *International Journal of Food Microbiology* 73(1): 1-9.
- Medlicott, A., P, Reynolds, S., B & Thompson, A., K (1986).** Effects of temperature on the ripening of mango fruit (*Mangifera indica* L. var. 'Tommy Atkins'). *J. Sci. Food Agric* 37: 469-474.
- Methacanon, P., Prasitsilp, M., Pothsree, T. & Pattaraarchachai, J. (2003).** Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Polymers* 52(2): 119-123.
- Min, S., Harris, L. & Krochta, J., M (2005).** Antimicrobial effects of Lactoferrin, Lysozyme, and the Lactoperoxidase System and Edible Whey Protein Films Incorporating the Lactoperoxidase System against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science* 70: 332-338.
- Min, S. & Krochta, J., M (2005).** Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems. *Journal of Food Protection* 70(2): M87-M94.

- Min, S., Krochta, J., M & Rumsey, T., R (2007).** Diffusion of thiocyanate and hypothiocyanite in whey protein films incorporating the lactoperoxidase system. *Journal of Food Engineering* 80(4): 1116-1124.
- Moalemiyan, M., Vikram, A. & Kushalappa, A., C (2007).** Detection and discrimination of two fungal diseases of mango (cv. Keitt) fruits based on volatile metabolite profiles using GC/MS Postharvest Biology and Technology 45(1): 117-125.
- Möller, H., Grelier, S., Pardon, P. & Coma, V. (2004).** Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HPMC-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(21): 6585-6591.
- Mujica-Paz, H. & Gontard, N. (1997).** Oxygen and Carbon Dioxide permeability of wheat gluten film: effect of relative humidity and temperature. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4101-4105.
- Muzzarelli, R., Biagini, G., DeBenedittis, A., Mengucci, P., Majni, G. & Tosi, G. (2001).** Chitosan-oxychitin coatings for prosthetic materials. *Carbohydrate Polymers* 45(1): 35-41.
- Naidu, A. (2000).** Lactoferrin, lactoperoxidase. New York, CRC.
- Naidu, A. (2000).** Lactoperoxidase Boca Raton, FL.
- Nakasome, H., Y, & Paull, R., E. (1998).** Tropical fruits New York.
- Nascimento, T., Rego, C. & Oliveira, H. (2007).** Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 46(2): 218-224.
- Nguyen, D., D, Ducamp, M., N, , Dornier, M., Montet, D. & Loiseau, G. (2005).** Effect of Lactoperoxidase System against three major causal agent of disease in Mangoes. *Journal of Food Protection* 68: 000-000.
- No, H., K. , Meyers, S., P, Prinyawiwatkul, W. & Xu, Z. (2007).** Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *Journal of Food Science* 72(5): 87-100.
- No, H. K., Nah, J. W. & Meyers, S. P. (2003).** Effect of time/temperature treatment parameters on depolymerization of chitosan. *Journal of applied polymer science* 87(12): 1890-1894.
- No, H. K., Young Park, N., Ho Lee, S. & Meyers, S. P. (2002).** Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology* 74(1): 65-72.



- Oram, J. & Reiter, B. (1966).** The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. The effect of the inhibitory system on susceptible and resistant strains of group N streptococci. *Biochemical Journal* 100(2): 373.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Bégin, A. & Holley, R. A. (2000).** Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology* 62(1): 139-148.
- Özden, Ç. & Bayindirli, L. (2002).** Effects of combinational use of controlled atmosphere, cold storage and edible coating applications on shelf life and quality attributes of green peppers. *European Food Research and Technology* 214(4): 320-326.
- Pakkanen, R. & Aalto, J. (1997).** Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrums. *Int Dairy J.* 7: 285-297.
- Park, S., Marsh, K. & RHIM, J. (2002).** Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films Affected by the Type of Organic Solvents. *Journal of Food Science* 67: 194-197.
- Park, S. I., Daeschel, M. A. & Zhao, Y. (2004).** Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. *Journal of Food Science* 69(8): 215-221.
- Park, S. Y., Jun, S. T. & Marsh, K. S. (2001).** Physical properties of PVOH/chitosan-blended films cast from different solvents. *Food hydrocolloids* 15(4-6): 499-502.
- Paul, W. & Sharma, C. (2000).** Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review. *STP pharma sciences* 10(1): 5-22.
- Paull, R., Chen, N. & GOO, T. (1989).** Waxing and plastic wraps influence water loss from papaya fruit during storage and ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 114(6): 937-942.
- Peng, Y., Han, B., Liu, W. & Xu, X. (2005).** Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan. *Carbohydrate Research* 340(11): 1846-1851.
- Peter, M. G. (1995).** Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* 32(4): 629-640.
- Peyron, A. (1991).** L'enrobage et les produits filmogènes: un nouveau mode d'emballage. *Viandes et produits carnés* 12(2): 41-46.
- Photchanachai, S., Singkaew, J. & Thamthong, J. (2006).** Effects of chitosan seed treatment on *Colletotrichum* sp. and seedling growth of chili cv. "Jinda". *Acta Horticulturae*(712, ): 585-590.
- Pino, J. A. & Mesa, J. (2006).** Contribution of volatile compounds to mango (*Mangifera indica* L.) aroma. *Flavour and fragrance journal* 21(2): 207-213.
- Ploetz, R. (2003).** 15 Diseases of Mango. *Diseases of tropical fruit crops*: 327.

- Ploetz, R., C (1994).** Anthracnose Mango disease caused by fungi. Compendium of Tropical Fruit Diseases. R. Ploetz, C, G. Zentmyer, A, W. Nishijima, T, K. Rohrbach, G & H. Ohr, D. Minnesota, USA, American Phytopathological Society Press. St. Paul: 35–36.
- Ploetz, R., C & Prakash, O. (1997).** Foliar, floral and soilborne diseases of mango. The Mango: Botany, Production and Uses. R. Litz, E. Wallingford, CAB International: 281-325.
- Ploetz, R. C., Benscher, D., Vazquez, A., Colls, A., Nagel, J. & Schaffer, B. (1996).** A reexamination of mango decline in Florida. Plant Disease 80(6): 664-668.
- Popper, L. & Knorr, D. (1997).** Inactivation of yeast and filamentous fungi by the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate-system. Food/Nahrung 41(1): 29-33.
- Pourtois, M., Binet, C., Van Tieghem, N., Courtois, P., Vandenabeele, A. & Thiry, L. (1990).** Inhibition of HIV infectivity by lactoperoxidase-produced hypothiocyanite. Journal de biologie buccale 18(4): 251.
- Pruitt, K., M & Reiter, B. (1985).** Biochemistry of peroxidase system: antimicrobial effects In The Lactoperoxidase System: Chemistry and Biological Significance. K. Pruitt, M & J. Tenovuo, O. New York, Marcel Dekker, Inc: 143-178.
- Prusky, D. (1996).** Pathogen quiescence in postharvest diseases. Annual Review of Phytopathology 34(1): 413-434.
- Prusky, D., Fuchs, Y. & Yanko, U. (1983).** Assessment of latent infections as a basis for control of postharvest disease of mango. Plant Disease 67(7): 816-818.
- Prusky, D., Kobiler, I., Miyara, I. & Alkan, N. (2009).** Fruit Diseases. The Mango: Botany, Production and Uses: 210.
- Reiter, B., Fulford, R. J., Marshall, V. M., Yarrow, N., Ducker, M. & Knutsson, M. (1981).** An evaluation of the growth promoting effect of the lactoperoxidase system in newborn calves. Animal Production 32(03): 297-306.
- Reiter, B. & Harnulv, G. (1984).** Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. Journal of Food Protection 47(9): 724-732.
- Reiter, B. & Perraudin, J. P. (1991).** Lactoperoxidase: biological functions. Peroxidases in chemistry and biology 1: 143.
- Revol-Junelles, A. M., Boussouel, N., Ramet, J. P. & Milliere, J. B. (2001).** Antibacterial activities of lactoperoxidase systems(LPS) modified by I super (-) and IO super (-) sub (3) anions. Milchwissenschaft 56(6): 329-332.

- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R. & Martín-Belloso, O. (2009).** Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology* 20(10): 438-447.
- Roller, S. & Covill, N. (1999).** The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 47(1): 67-77.
- Rungsardthong, V., Wongvuttanakul, N., Kongpien, N. & Chotiwaranon, P. (2006).** Application of fungal chitosan for clarification of apple juice. *Process Biochemistry* 41(3): 589-593.
- Ryu, S., Rhim, J., Roh, H. & Kim, S. (2002).** Preparation and physical properties of zein-coated high-amylose corn starch film. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 35(8): 680-686.
- Sagoua, W. (2009).** Etude synergique du couplage du Système Lactoperoxydase avec d'autres molécules naturelles actives ayant des propriétés antifongiques pour l'amélioration de la conservation en frais des bananes Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- Salveit, M., E (2005).** Influence of heat shocks on the kinetics of chilling-induced ion leakage from tomato pericarp discs. *Postharvest Biol. Technol* 36 87-92.
- Sánchez-González, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. & Cháfer, M. (2011).** Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology* 60(1): 57-63.
- Sanchez, C. (1990).** Faisabilité d'un nouveau procédé de protection des surfaces alimentaire. DEA, ENSAIA.
- Sangchote, S. (1998).** Fruit rots of mangosteen and their control. *Post-harvest Handling of Tropical Fruit*. B. Champ, R, E. Highley & G. Johnson, I. Canberra, Australian. Centre for International Agricultural Research (ACIAR): 81-86.
- Santosa, F. X. B. & Padua, G. W. (1999).** Tensile properties and water absorption of zein sheets plasticized with oleic and linoleic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(5): 2070-2074.
- Seacheol, M., Linda, J., H & John, M., K (2005).** Antimicrobial Effects of Lactoferrin, Lysozyme, and the Lactoperoxidase System and Edible Whey Protein Films Incorporating the Lactoperoxidase System Against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli O157:H7*. *Food Microbiology and Safety* 70: 332-338.

- Sebti, I. & Coma, V. (2002).** Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. *Carbohydrate Polymers* 49(2): 139-144.
- Seifu, E., Buys, E., M & Donkin, E., F (2005).** Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology* 16: 137-154.
- Seifu, E., Buys, E. M. & Donkin, E. F. (2005).** Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology* 16(4): 137-154.
- Şenel, S. & McClure, S. J. (2004).** Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56(10): 1467-1480.
- Shah, B. L., Matuana, L. M. & Heiden, P. A. (2005).** Novel coupling agents for PVC/wood-flour composites\*. *Journal of Vinyl and Additive Technology* 11(4): 160-165.
- Shah, N. P. (2000).** Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition* 84(1): 3.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. & Jeon, Y.-J. (1999).** Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology* 10 (2): 37-51.
- Singh, K., K (1967).** Climate and cultivation. The mango. In. *Projet de transformation et conditionnement des mangues en Côte- d'Ivoire*. Montpellier, SIARC.
- Siragusa, G., A & Dickson, J., S (1992).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* on beef tissue by application of organic acids immobilized in a calcium alginate gel. *Journal of Food Science* 57: 293-296.
- Sivakumar, D., Jiang, Y. & Yahia, E., M. (2011).** Maintaining mango (*Mangifera indica* L.) fruit quality during the export chain. *Food Research International* 44(5): 1254-1263.
- Slippers, B., Johnson, G. I., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. & Wingfield, M. J. (2005).** Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. *Mycologia* 97(1): 99-110.
- Song, Y., Babiker, E., Usui, M., Saito, A. & Kato, A. ( 2002).** Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates. *Food Res Int* 35: 459-466.
- Soumah, B., B (1988).** *Projet de transformation et de conditionnement des mangues à Boundial en Côte d'Ivoire*. Montpellier, SIARC (Section des Ingénieurs Alimentaire / région chaude).



- Srinivasa, P., Baskaran, R., Ramesh, M., Harish Prashanth, K. & Tharanathan, R. (2002).** Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. *European Food Research and Technology* 215(6): 504-508.
- Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N., Kumar, K. R. & Tharanathan, R. N. (2004).** Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. *Journal of Food Engineering* 63(1): 79-85.
- Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N. & Tharanathan, R. N. (2007).** Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids* 21(7): 1113-1122.
- Srinivasa, P. C., Ravi, R. & Tharanathan, R. N. (2007).** Effect of storage conditions on the tensile properties of eco-friendly chitosan films by response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 80(1): 184-189.
- Srinivasa, P. C., Susheelamma, N. S., Ravi, R. & Tharanathan, R. N. (2004).** Quality of mango fruits during storage. Effect of synthetic and eco-friendly films. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 818–824.
- Suyatma, N. E., Tighzert, L. & Copinet, A. (2005).** Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3950-3957.
- Tan, S. C., Tan, T. K., Wong, S. M. & Khor, E. (1996).** The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydrate Polymers* 30(4): 239-242.
- Taşdelen, Ö. & Bayindirli, L. (1998).** Controlled atmosphere storage and edible coating effects on storage life and quality of tomatoes. *Journal of food processing and preservation* 22(4): 303-320.
- Tenovuo, J., Mansson-Rahemtulla, B., Pruitt, K. & Arnold, R. (1981).** Inhibition of dental plaque acid production by the salivary lactoperoxidase antimicrobial system. *Infection and immunity* 34(1): 208-214.
- Tharanathan, R. N. (2003).** Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology* 14(3): 71-78.
- Thomas, E., L (1985).** Products of lactoperoxidase-catalysed oxidation of thiocyanate and halides. The lactoperoxidase system: Chemistry and biological significance. K. Pruitt, M & J. Tenovuo, O New York, Marcel Dekker: 31-53.
- Thomas, E. L. & Aune, T. M. (1978).** Susceptibility of *Escherichia coli* to bactericidal action of lactoperoxidase, peroxide, and iodide or thiocyanate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 13(2): 261-265.

- Thumula, P. (2006).** Studies on storage behaviour of tomatoes coated with chitosan-lysozyme films, McGill University.
- Tischer, W. & Kasche, V. (1999).** Immobilized enzymes: crystals or carriers? Trends in Biotechnology 17(8): 326-335.
- Torr, K. M., Chittenden, C., Franich, R. A. & Kreber, B. (2005).** Advances in understanding bioactivity of chitosan and chitosan oligomers against selected wood-inhabiting fungi. Holzforschung 59(5): 559-567.
- Torres, J., A & Kare, M. (1985).** Microbial stabilisation of intermediate moisture food surfaces III. Effects of surface preservative concentration and surface pH control on microbial stability of an intermediate moisture cheese analog. J. Food Proc. pres. 9 107-118.
- Trotignon, J. P., Piperaud, M., Verdu, J. & Dobraczynski, A.(1996).** Precis de matieres plastiques: Structures, Propriétés, Mise en oeuvre et Normalisation Àme Paris, Nathan. Eds.
- Valerie, M., E & Reiter, B. (1980).** Comparison of the antibacterial activity of the hypothiocyanite anion towards *Streptococcus lactis* and *Escherichia coli*. . Journal of General Microbiology 120: 513-516.
- van Hooijdonk, A., Kussendrager, K. & Steijns, J. (2000).** In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. British Journal of Nutrition 84(S1): 127-134.
- Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J. & Gerschenson, L. N. (2009).** Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. Food Research International 42(7): 762-769.
- Verrier, P. (2005).** Plastifiants, Ed. Techniques Ingénieur.
- Vojdani, F. & Torres, J. A. (1989).** Potassium Sorbate Permeability Of Methylcellulose And Hydroxypropyl Methylcellulose Multi-Layer Films . Journal of food processing and preservation 13(6): 417-430.
- Weetall, H. H. (1974).** Immobilized enzymes. Analytical applications. Analytical Chemistry 46(7): 602-615.
- Whistley, R., L & Daniel (1991 ).** Functions of polysaccharides in Foods. Food Additives. A. Branen, L, P. Davidson, M & S. Salminen. New York, Marcel Dekker: 395-424.
- Wilson, C. W., Shaw, P. E. & Knight Jr, R. J. (1990).** Importance of some lactones and 2, 5-dimethyl-4-hydroxy-3 (2H)-furanone to mango (*Mangifera indica* L.) aroma. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38(7): 1556-1559.

- Wolfson, L. & Sumner, S. (1993).** Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. *Journal of Food Protection* 56(10): 887.
- Wong, D., W., S, Gatineau, F., A., Gregorski, K., S , Tillin, S., J , Pavlath, A., E & .. (1992).** Chitosan-lipid films : Microstructure and surface energy. *Journal of Agriculture. Food Chem*(40): 540-544.
- Yamaguchi, Y., Semmel, M., Stanislawski, L., Strosberg, A. & Stanislawski, M. (1993).** Virucidal effects of glucose oxidase and peroxidase or their protein conjugates on human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 37(1): 26-31.
- Yang, T. C., Chou, C. C. & Li, C. F. (2005).** Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. *International Journal of Food Microbiology* 97 (3): 237-245.
- Ye, W., Leung, M. F., Xin, J., Kwong, T. L., Lee, D. K. L. & Li, P. (2005).** Novel core-shell particles with poly-butyl acrylate) cores and chitosan shells as an antibacterial coating for textiles. *Polymer* 46 (23): 10538-10543.
- Yenjit, P., Issarakraisila, M., Intana, W. & Chantrapromma, K. (2010).** Fungicidal activity of compounds extracted from the pericarp of Areca catechu against *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro and in mango fruit. *Postharvest Biology and Technology* 55: 129-132.
- Zapico, P., Gaya, P., De Paz, M., Nunez, M. & Medina, M. (1991).** Influence of breed, animal, and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk. *Journal of Dairy Science* 74 (3): 783-787.
- Zhang, M., Tan, T., Yuan, H. & Rui, C. (2003).** Insecticidal and fungicidal activities of chitosan and oligo-chitosan. *Journal of bioactive and compatible polymers* 18(5): 391-400.
- Zhang, S. & Mustapha, A. (1999).** Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. *Journal of Food Protection*. 174; 62 (10): 1123-1127.
- Zhu, A., Yuan, L. & Liao, T. (2008).** Suspension of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles stabilized by chitosan and o-carboxymethylchitosan. *International journal of pharmaceutics* 350 (1-2): 361-368.
- Ziani, K., Oses, J., Coma, V. & Maté, J. I. (2008).** Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with

different degree of deacetylation. LWT - Food Science and Technology 41(10): 2159-2165.



## Résumé

L'exportation des mangues est limitée par le mûrissement rapide et la prolifération microbienne sur les fruits. Cette thèse propose une nouvelle approche sûre et saine utilisant des molécules d'origine naturelle pour améliorer la conservation post-récolte des mangues et ainsi participer à la préservation de la santé des consommateurs et à une amélioration des potentialités du commerce international de certains pays exportateurs. Ces travaux ont montré que l'immobilisation du système lactoperoxydase dans le film de chitosane appliqué sur l'épiderme des mangues pouvait maintenir la qualité microbiologique et physicochimique des fruits traités. Le couplage Chitosane-Système lactoperoxydase a prolongé la durée de conservation des mangues durant plus de deux semaines sans altérer leurs qualités organoleptiques.

Ce travail a permis également de mettre en évidence la synergie entre le système lactoperoxydase et la concentration de chitosane. Un enrobage optimum de 1% de chitosane a permis de fixer le système enzymatique et de maintenir les mangues en bon état sanitaire. La présence d'iode dans le système lactoperoxydase n'agit pas de manière significative sur la conservation des mangues.

**Mots clés :** Mangue, système lactoperoxydase, chitosane, conservation, physiologie post-récolte.

---

## Abstract:

The mango export is limited by the rapid ripening and microbial growth on the fruit. This thesis proposes a new approach to safe and healthy using natural molecules to improve post-harvest conservation of mango and thus help preserve the health of consumers and improved the potential of international trade in certain exporting countries. This work shown that the immobilization of the lactoperoxidase in the chitosan film and applied as coating of mangoes could maintain the microbiological and physicochemical quality of fruits. Chitosan-coupling lactoperoxidase system extended the shelf life of mangoes for over two weeks without affecting their organoleptic quality.

This work also helped to highlight the synergy between the LPS and the concentration of chitosan. An optimum coating made from 1% chitosan allowed to fix the enzyme system and to maintain the mangoes in a good sanitary condition. The presence of iodine in the LPS does not act significantly on the conservation of mangoes.

**Keywords:** Mango, lactoperoxidase system, chitosan, conservation, post-harvest physiology.